

Das Vomeronasalorgan, ein Zielorgan für Vitamin D

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Dipl.-Biol. Andrea Rodewald

geboren am 30.05.1984 in Werdau

Gutachter:

Erster Gutachter: Prof. Dr. Gustav Jirikowski

Zweiter Gutachter: PD Dr. Udo Gansloßer

Dritter Gutachter: Prof. Dr. Martin Witt

Tag der öffentlichen Verteidigung: 02.10.2018

meiner Mutter gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1. Das Vomeronasalorgan	3
2.1.1. Morphologie des Vomeronasalorgans	3
2.1.2. Molekularer Aufbau	5
2.2. Das olfaktorische Markerprotein	6
2.3. Pheromone	7
2.3.1. Pheromone im olfaktorischen System	7
2.3.2. Steroide als Pheromone	8
2.3.3. Generelle Wirkungsmechanismen auf molekularer Ebene	9
2.4. Steroidbindungsglobuline im Vomeronasalorgan	10
2.5. Neurosteroid	11
2.6. Vitamin D	13
2.6.1. Biosynthese und Derivate von Vitamin D	13
2.6.2. Der Vitamin D-Rezeptor	14
2.6.2.1. Genomische Wirkungsmechanismen	14
2.6.2.2. Nicht-genomische Signalwege	15
2.6.3. Das Vitamin D-bindende Protein	16
3. Ziele der Arbeit	18
4. Publikationen	19
4.1. Distribution of olfactory marker protein in the rat vomeronasal organ.	19
Rodewald, A., Gisder, D., Gebhart, V.M., Oehring, H., Jirikowski, G.F., Journal of Chemical Neuroanatomy 77, 19-23, 2016.	
4.2. The rat vomeronasal organ is a vitamin D target.	25
Rodewald, A., Gebhart, V.M., Oehring, H., Jirikowski, G.F., Journal of Chemical Neuroanatomy 81, 42-47, 2017.	
4.3. Steroidal pheromones and their potential target sites in the vomeronasal organ	32
Rodewald, A., Mills, D., Gebhart, V.M., Jirikowski, G.F., Steroids, in Druck.	

5. Publikation in Vorbereitung: Olfaktorische Untersuchungen an Hunden und Wölfen.....	40
5.1. Einleitung	40
5.2. Material und Arbeitstechniken	40
5.3. Ergebnisse	43
6. Diskussion	49
6.1. Das olfaktorische Markerprotein im Vomeronasalorgan	49
6.2. Das Vomeronasalorgan als Zielort für Steroidhormone.....	51
6.3. Mögliche Antwortmechanismen auf Vitamin D-Derivate	53
6.4. Die verhaltensbiologische Bedeutung von Vitamin D bei Säugetieren	57
7. Schlussfolgerungen.....	62
8. Literaturverzeichnis	64
9. Anhang	V
9.1. Abbildungsverzeichnis	V
9.2. Tabellenverzeichnis.....	V
9.3. Lebenslauf	VI
9.4. Publikationsliste	VIII
9.5. Danksagung	X
9.6. Ehrenwörtliche Erklärung	XI

Abkürzungsverzeichnis

CBG	Transcortin (corticosteroid binding globulin)
DBP	Vitamin-D-bindendes Protein
NSE	nicht-sensorisches Epithel
OMP	olfaktorisches Markerprotein
RT-PCR	reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (reverse transcriptase-polymerase chain reaction)
SE	sensorisches Epithel
SHBG	sexualhormonbindendes Globulin
V1R	Vomeronasalrezeptor Typ 1
V2R	Vomeronasalrezeptor Typ 2
VDR	Vitamin D-Rezeptor
VDRm	membranständiger Vitamin D-Rezeptor
VDRn	nukleärer Vitamin D-Rezeptor
VNO	Vomeronasalorgan

1 Zusammenfassung

Das Vomeronasalorgan (VNO) dient primär der Pheromondetektion. Es besteht im Wesentlichen aus einem nicht-sensorischen Epithel (NSE) mit bisher unbekannter Funktion und dem sensorischen Epithel (SE). Pheromone, die darüber aufgenommen werden können, dienen der intraspezifischen Kommunikation und spielen besonders bei Sexual-, Brutpflege- und Territorialverhalten eine Rolle. Sie bilden eine heterogene Gruppe von Molekülen: unter anderem können Alkohole, Proteine, Peptide und Steroide genutzt werden. Die Antwortmechanismen können innerhalb von Stunden oder Tagen, aber auch sehr schnell, innerhalb von Sekunden oder Minuten erfolgen. Die grundlegenden Mechanismen dieser schnellen Antwort auf Steroidhormone sind kaum verstanden.

Auch Vitamin D-Derivate zählen zu den (Seco-)Steroiden. Das zentrale Thema dieser Arbeit ist die Frage, ob Vitamin D-Derivate ähnliche Funktionen haben wie andere Steroide und über das VNO aufgenommen werden können. Über immunhistochemische Markierungen an Semidünnschnitten, in-situ Hybridisierung und RT-PCR wurde untersucht, ob der Vitamin D-Rezeptor (VDR) und das Vitamin D-bindende Protein (DBP) im VNO vorkommen. Eine verhaltensbiologische Pilotstudie sollte Aufschluss darüber geben, ob Vitamin D-Derivate nasal wahrgenommen werden.

Die immunhistochemischen Untersuchungen an VNOs von 8 Ratten und 3 Mäusen des Wildtyps ergaben, dass VDR und DBP in den primären Sinneszellen des SEs und einzelnen Zellen des NSEs vorkommen. Die sensorischen Neurone des SEs zeigen Markierungen für VDR im Zytosol, einigen Zellkernen und den dendritischen Vorwölbungen auf der apikalen Seite. Das DBP erscheint vermehrt in den Dendriten der gleichen Neurone, ebenfalls in wenigen Zellkernen und kolokalisiert mit VDR in den dendritischen Vorwölbungen. Die vomeronasalen Drüsen sind DBP-positiv, zeigen aber keine Markierung für VDR. DBP wird vermutlich aus den vomeronasalen Drüsen sezerniert, um Vitamin D-Derivate aus dem Lumen zu binden und zu den sensorischen Zellen zu transportieren. In einzelnen Zellen des NSEs konnte zytosolisch ebenfalls eine Kolokalisation beider Moleküle nachgewiesen werden. Diese Zellen zeigen zusätzlich für VDR eine starke immunhistochemische Markierung der Zilien und darunter liegenden Axone.

Weitere immunhistochemische Markierungen des VNOs mit einem Antikörper gegen das olfaktorische Markerprotein (OMP) (ein in sensorischen Sinneszellen des olfaktorischen

Systems vorkommendes Protein) zeigten zum einen, dass alle sensorischen Neurone und der Vomeronasalnerv OMP-positiv erscheinen. Zum anderen konnte ebenfalls eine Markierung des Zytosols und der Zilien einzelner Zellen des NSEs beobachtet werden.

Die reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) bestätigte eine intrinsische Expression von DBP und VDR im VNO der Ratte. Das VNO ist demzufolge wahrscheinlich ein Zielorgan für Vitamin D-Derivate, wobei nicht nur das SE, sondern auch das NSE für die Detektion eine Rolle zu spielen scheint. Damit ist das NSE sehr wahrscheinlich nicht, wie bisher angenommen, funktionslos bei der Detektion von Molekülen.

In den ethologischen Untersuchungen wurden 10 Hunden und 9 Wölfen verschiedene Konzentrationen des Vitamin D-Derivats Provitamin D in Ethanol gelöst auf einem Holzblock gegeben. Dieser wurde zusammen mit einem Kontroll-Holzblock (Ethanol ohne Provitamin D) olfaktorisch angeboten. Die Riechzeiten an den Provitamin D-Proben wurden mit denen an den Kontrollen verglichen. Diese ersten verhaltensbiologischen Tests zeigen die Tendenz, dass Hunde und Wölfe Provitamin D nasal wahrnehmen können. Die weiblichen Tiere nahmen eher die hohen Konzentrationen wahr. Die Männchen beider Arten zeigten im Vergleich zur Kontrolle auch an den niedrigsten Konzentrationen längere Riechzeiten als die Weibchen. Besonders die Männchen beider Arten hatten in etwa 70 % der Fälle den ersten Kontakt zur Provitamin D-Probe und nicht zur Kontrolle. Vermutlich nehmen die Männchen selbst geringste Konzentrationen bereits vor direktem Kontakt wahr, was dafür spricht, dass trotz der geringen Volatilität Spuren des Moleküls für Rüden und Wolfsmännchen über die Luft wahrnehmbar sind. Über weitere verhaltensbiologische Tests soll zukünftig evaluiert werden, welche Vitamin D-Derivate wahrnehmbar sind und ob sie Funktionen in der chemischen Kommunikation, wofür besonders das VNO eine Rolle spielt, übernehmen. Die morphologischen und molekularbiologischen Ergebnisse belegen bereits die Grundvoraussetzung für eine Aufnahme von Vitamin D im VNO, da sowohl VDR als auch DBP vorkommen.

In der Veterinärmedizin könnte Vitamin D zukünftig so eine Rolle in der bereits etablierten Pheromonthherapie von Haustieren spielen. Auch beim Menschen wird mittlerweile die Existenz eines vomeronasalen Epithels angenommen, sodass sich eine mögliche nasale Applikation von Vitamin D-Derivaten als Grundlage neuer Therapieformen in der Humanmedizin entwickeln könnte.

2 Einleitung

2.1 Das Vomeronasalorgan

Das 1813 von Ludwig Jacobson beschriebene Jacobson'sche Organ oder Vomeronasalorgan (VNO) (Jacobson et al. 1998) befindet sich bei den meisten Wirbeltierarten im Bereich des unteren Nasenseptums. Es dient besonders der Chemorezeption der für das Sozialverhalten wichtigen Pheromone (Dulac und Torello 2003).

2.1.1 Morphologie des Vomeronasalorgans

Das VNO entspringt bei Säugetieren am Os incisivum, welches bei den meisten Altwelt-Primaten wie dem Menschen adult nicht mehr als separater Knochen im Palatum durum ausgeprägt ist. Der Ductus nasopalatinus, eine Weichteil-Struktur im Canalis incisivus, verbindet bei den meisten Tieren die Mundhöhle mit dem VNO (Wohrmann-Repenning

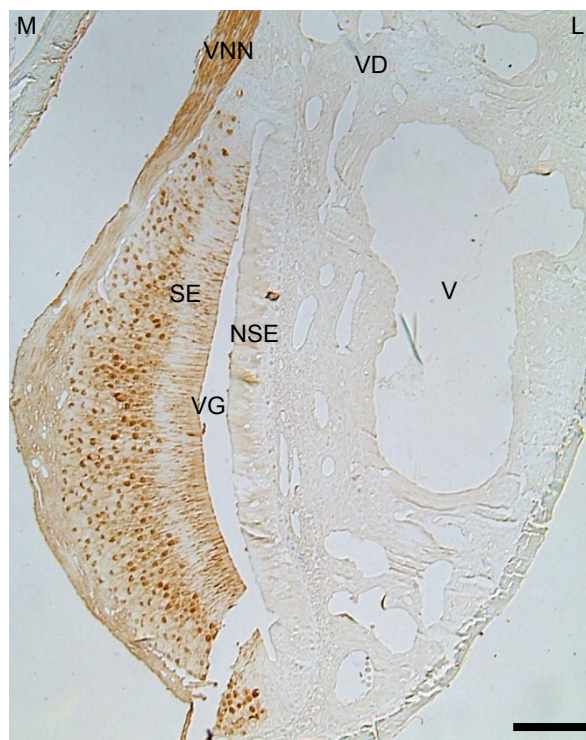


Abb. 1: Frontalschnitt durch das Vomeronasalorgan der Maus (M: medial, L: lateral). SE = sensorisches Epithel, NSE = nicht-sensorisches Epithel, VG = vomeronasaler Gang, VD = vomeronasale Drüsen, VNN = Vomeronasalnerv; Maßstab: 100 μ m (Rodewald et al. 2017, in Druck)

1984). Am Nasenseptum wird ein blind endender Gang, der Ductus vomeronasalis nach kaudal abgegeben. Ausnahmen bilden hier z. B. das Pferd, bei dem es keine Verbindung

zur Mundhöhle gibt (Böhme 2004). Das Flehmen (Hochziehen der Oberlippe) mit gleichzeitigem Einatmen wird als verhaltensbiologische Antwort auf Moleküle, die zur chemischen Kommunikation dienen (Pheromone), gedeutet (Sankar und Archunan 2004). Bei Säugetierarten, deren Verbindung zur Mundhöhle verschlossen ist, wird dieses (wenn es noch in dieser Form auftritt) als genetisch vorprogrammiertes Verhalten und damit als evolutionäres Relikt interpretiert (Ahne 2000). Es kann auch im Zustand allgemeiner Erregung gezeigt werden.

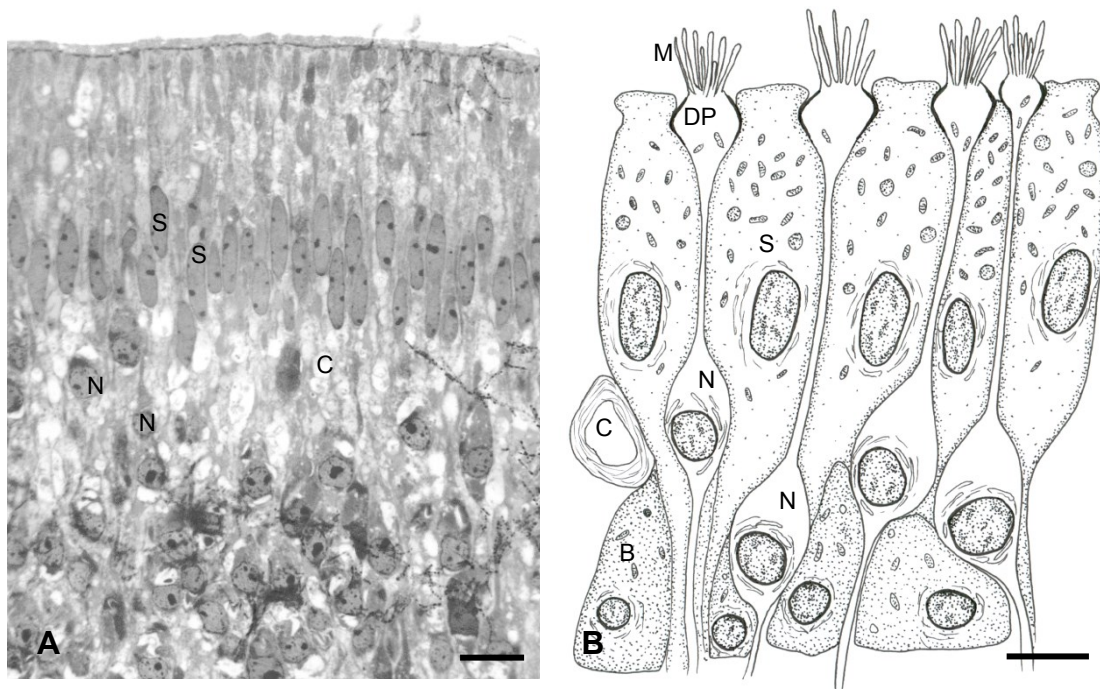


Abb 2.: Sensorisches Epithel der Ratte. A: Semidünnschnitt. Maßstab: 10 μ m. B: Übersichtszeichnung der Zellen im sensorischem Epithel. Maßstab: 5 μ m. S = Stützzelle, N = sensorisches Neuron, DP = apikale Vorwölbung der sensorischen Neurone, M = Mikrovilli, C = Kapillare, B = Basalzelle. (Rodewald, unveröffentlicht)

Die mediale Seite des vomeronasalen Gangs ist mit sensorischem Epithel (SE) ausgekleidet, während sich auf der lateralen Seite das nicht-sensorische Epithel (NSE) befindet (Doving und Trotier 1998) (Abb. 1). Das SE enthält sensorische Neurone, Stützzellen, Basalzellen und ist zudem stark kapillarisiert (Kratzing 1971, Vaccarezza et al. 1981) (Abb. 2A, 2B). Die Axone der sensorischen Neurone projizieren gebündelt als Vomeronasalnerv zum akzessorischen olfaktorischen Bulbus – von hier werden die Informationen weiter zum limbischen System, zu Anteilen der Amygdala (wie das mediale und posteromediale cortikale Kerngebiet) und dem Hypothalamus (u. a. den Bereichen für Fortpflanzungs- und Aggressionsverhalten) weitergeleitet (Barber und Raisman 1974, Dulac und Wagner 2006). Apikal erscheinen die Neurone als erweiterte Vorwölbung, an

die sich Mikrovilli, die in das Lumen hineinragen, anschließen (Abb. 2B) (Hofer et al. 2000). Das dem SE gegenüberliegende NSE (Abb. 3A) besteht aus Basalzellen und bei adulten Ratten aus einem sogenannten „helleren Zelltyp“, der Mikrovilli und Zilien trägt, und einem „dunkleren Zelltyp“, der ausschließlich Zilien trägt (Eltony und Elgayar 2011, Elgayar et al. 2014).

In der Lamina propria, lateral des NSEs, liegen seröse oder seromuköse Drüsen (Abb. 3B), reich an sekretorischen Vesikeln, die zwischen dem NSE und SE in den vomeronasalen Gang münden (Mendoza 1986, Roslinski et al. 2000). Ebenfalls lateral des NSEs liegen ein bis zwei größere Venen (Abb. 1), die einen Pumpmechanismus auslösen können. Dieser beeinflusst den Durchmesser des vomeronasalen Gangs und initiiert einen Austausch zwischen Molekülen der Nasen- bzw. Mundhöhle und dem VNO (Meredith und O'Connell 1979, Keverne 1999).

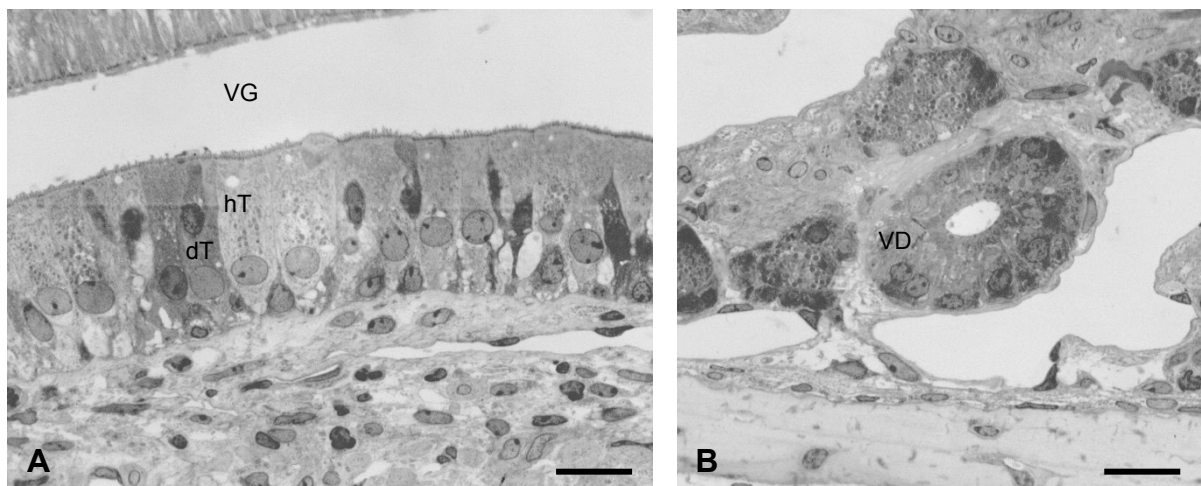


Abb. 3: A: Semidünnschnitt des nicht-sensorischen Epithels der Ratte. VG = vomeronasaler Gang, hT = heller Zelltyp, dT = dunkler Zelltyp. Maßstab: 10 μ m B: Semidünnschnitt der vomeronasalen Drüsen (VD). Maßstab: 10 μ m. (Rodewald et al. 2017b)

2.1.2 Molekularer Aufbau

Im SE wurden zwei charakteristische Rezeptorenfamilien für die Pheromondetektion in der Membran der Neurone nachgewiesen. Die Rezeptoren bestehen aus sieben Transmembrandomänen und sind an G-Proteine gekoppelt. Die Familie des Vomeronasalrezeptors Typ 1 (V1R) befindet sich im apikalen Bereich des SEs. Über sie können Metabolite einiger Steroide und olfaktorische Signale des Urins wahrgenommen werden (Liberles 2014). Die Funktion dieser Rezeptoren ist an die α -Untereinheit Gai2 gekoppelt. Die Familie des Vomeronasalrezeptors Typ 2 (V2R) befindet sich in den basal gelegenen Neuronen des SEs und nutzt die G-Protein α -Untereinheit Gao.

Diese Rezeptoren sind an der Detektion spezieller Proteine und Peptide mit Pheromonfunktion wie beispielsweise die Major urinary proteins bei Mäusen (Francia et al. 2014) oder Aphrodisin, ein Protein, welches in den Bartholin-Drüsen von Hamstern nachgewiesen wurde, beteiligt (Singer et al. 1986). Außerdem wurde ein dritter Rezeptortyp im VNO entdeckt (Riviere et al. 2009): Der Formylpeptidrezeptor spielt eigentlich im Immunsystem eine Rolle, wurde aber auch in apikalen und basalen Bereichen der Neurone des SEs nachgewiesen, die weder V1R noch V2R exprimieren. Ob der Formylpeptidrezeptor an der Pheromonwahrnehmung beteiligt ist, ist noch unklar (Liberles 2014).

2.2 Das olfaktorische Markerprotein

Das 19 kDa schwere olfaktorische Markerprotein (OMP) wird in den sensorischen Neuronen des Geruchssystems exprimiert (Margolis 1982, Wensley et al. 1995) und wird daher für selbige als molekularer Marker genutzt. So sind die sensorischen Neurone des olfaktorischen Epithels, des VNOs und weiterer olfaktorischer Organe wie des Grüneberg-Ganglions und des Septalorgans bei den bisher untersuchten Arten OMP-positiv (Weiler und Benali 2005, Smith et al. 2011, Barrios et al. 2014b, Barrios et al. 2014a). Lange war unbekannt, welche Funktion das OMP hat. Es gibt Hinweise, dass das OMP die Aufnahme von olfaktorischen Stimuli beeinflusst – die Riechsensitivität von Mäusen, deren OMP-Gen ausgeschaltet wurde, ist deutlich reduziert (Buiakova et al. 1996, Youngentob und Margolis 1999). In welchem Zusammenhang diese Beobachtungen mit der Pheromondetektion stehen und welche molekularen Mechanismen hinter der OMP-abhängigen Olfaktion stehen, ist noch nicht geklärt.

OMP konnte bei Mäusen zudem in weiteren Geweben unabhängig vom olfaktorischen System gefunden werden (Kang et al. 2015). Die Expression von OMP wurde beispielsweise im Herz- und Skelettmuskel, in der Leber und den Hoden nachgewiesen. Selbst eine Kolo-kalisation von OMP mit olfaktorischen Rezeptoren (olfr544, olfr558 und olfr1386) konnte in der Harnblase und der Schilddrüse gezeigt werden (Kang et al. 2015). Die Funktionen von OMP-gesteuerten Rezeptoren, die klassischerweise im olfaktorischen System vorkommen, sind bislang nicht völlig geklärt.

Die Expression von OMP beginnt bei Mäusen bereits pränatal am 14. Entwicklungstag. Während dieser Zeit entwickeln sich beispielsweise auch die sensorischen Synapsen im olfaktorischen Bulbus (Graziadei et al. 1980). Wildtyp- und *omp*^{-/-} Knockout-Mäuse

verschiedenen Alters (P7 – P16) hatten in Verhaltenstests die Wahl zwischen einem unverwandten laktierenden Mäuseweibchen und dem eigenen Muttertier: 78 % der Wildtypen mit intakter OMP-Expression präferierten das Muttertier, wohingegen nur 55 % der *omp*^{-/-} Knockout Jungtiere diese Präferenz zeigten (Lee et al. 2011). Diese exemplarisch aufgeführten Studien legen einen Zusammenhang zwischen der OMP-Expression und der Reifung der olfaktorischen Sinneszellen und damit auch der Entwicklung der Riechfähigkeit und der Mutterpräferenz während der ersten postnatalen Entwicklungstage nahe (Lee et al. 2011). Die OMP-Verteilung soll in dieser Arbeit speziell im VNO genauer untersucht werden.

2.3 Pheromone

Der Begriff Pheromon beschreibt chemische Substanzen, die durch ein Individuum freigesetzt werden und das Verhalten eines weiteren Individuums derselben Art beeinflussen (Karlson und Luscher 1959). Sie wirken beispielsweise auf das Fortpflanzungs-, Territorial- und Brutpflegeverhalten bei Wirbeltieren. In dieser Arbeit wird der Begriff Pheromon nicht nur auf Substanzen, die primär die Funktion der chemischen Kommunikation haben, beschränkt. Es können auch Substanzen, die weitere Funktionen unabhängig vom VNO haben, in die Kategorie Pheromon eingeordnet werden. Eine zentrale Frage dieser Arbeit beschäftigt sich damit, ob Vitamin D über das VNO aufgenommen werden kann. Da dieses Organ primär Pheromone detektiert, soll im Folgenden auf die Bedeutung und Wirkung der Pheromone eingegangen werden.

2.3.1 Pheromone im olfaktorischen System

Die Stoffgruppe der Pheromone ist sehr heterogen. Das erstmals beim Seidenspinner *Bombyx mori* beschriebene Pheromon Bombykol (Butenandt et al. 1961) gehört z. B. zu den Alkoholen. Bei Wirbeltieren sind es meist Peptide und Proteine (wie die Major urinary proteins oder Histocompatibility Complex der Klasse 1), Sulfide (wie Methylthio-Methanethiol im Mäuseurin oder Dimethyldisulfid im Vaginalsekret von Hamstern) oder Steroide, die als Pheromon wirken können (Brennan und Zufall 2006, Swaney und Keverne 2009, Ferrero und Liberles 2010). Nach der Ausscheidung über Urin, Schweiß, Speichel, Faeces oder Drüsensekrete können sie anschließend durch verschiedene Bereiche des olfaktorischen Systems wahrgenommen werden. Das VNO ist der wichtigste Detektor für Pheromone, aber auch das olfaktorische Epithel selbst ist besonders für volatile Pheromone sensibel (Liberles 2014). Das Grüneberg-Ganglion bei Mäusen nimmt

vorwiegend Alarmpheromone war (Brechtbuhl et al. 2008) und das Septalorgan im medialen Teil des Nasenseptums einiger Säugetiere ist vermutlich wie das VNO an der Wahrnehmung nicht oder gering volatiler Stoffe beteiligt (Ma et al. 2003).

Pheromone lassen sich in zwei Hauptgruppen unterteilen. Die sogenannten Primer-Pheromone lösen Antworten erst nach Stunden oder Tagen aus und verursachen nachhaltigere Effekte, die den Metabolismus beeinflussen (Tirindelli et al. 2009). Sie umfassen beispielsweise Pheromone, die den Bruce-Effekt auslösen (Bruce 1959): Der „Geruch“ eines unbekannten männlichen Individuums führt zu einem Abbruch früher Trächtigkeiten bei Mäusen. Nach neueren Forschungsergebnissen ist dieser Effekt sogar bei manchen Primaten wie Dscheladas (Roberts et al. 2012) beobachtbar. Der Lee-Boot-Effekt zeigt, dass innerhalb einer Gruppe von Mäuseweibchen, die längere Zeit ohne Männchen gehalten werden, der Östrus durch östrogenabhängige Pheromone, die über den Urin ausgeschieden werden, supprimiert wird (Van der Lee und Boot 1955). Die Weibchen nehmen diese Konzentration über das VNO wahr, was die eigene Produktion des luteinisierenden Hormons senkt. Das wiederum steigert den Prolaktinlevel, was zur Unterdrückung der Ovulation führt. Nach einer Kastration können Weibchen diesen Effekt nicht mehr bei Artgenossen auslösen (Clee et al. 1975). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Geschlechtsreife von jungen weiblichen Mäusen in Gruppen, in denen ebenfalls keine Männchen leben, verzögert eintritt (Vandenbergh-Effekt) (Vandenbergh 1967). In umgekehrter Weise beginnt die Pubertät bei der Anwesenheit männlicher Tiere oder ihres Urins sehr früh. Nach Entfernung des VNOs bei jungen weiblichen Mäusen tritt der Vandenbergh-Effekt nicht mehr auf (Lomas und Keverne 1982). Im Gegensatz zu den Primer-Pheromonen lösen Releaser-Pheromone schnelle Verhaltensantworten (z. B. beim Fortpflanzungs- oder Markierungsverhalten) aus, die auch nur einen kurzzeitigen Effekt haben. Sie spielen außerdem als Alarmpheromone eine Rolle bei der Wahrnehmung von Gefahren wie Prädatoren.

2.3.2 Steroide als Pheromone

Steroide wie Testosteron-, Progesteron- und Östrogenderivate sind bereits seit einiger Zeit als potente Pheromone bekannt. So induzieren Progesteronderivate, die im Urin männlicher Weißkehl-Buntbarsche identifiziert wurden, die Eireifung und -ablage bei geschlechtsreifen Weibchen (Keller-Costa et al. 2014). Das über den Speichel von Ebern abgegebene Androstenon als Testosteronderivat löst die beim Paarungsverhalten typischerweise auftretende Lordose bei Säuen aus (Dorries et al. 1995).

Auch beim Menschen sind Androgen- und Östrogenderivate als Pheromone beschrieben. Mehrere volatile Androgenderivate wie Androstenone, Androstadienone und Androstenole konnten in Schweißproben aus der Achselregion und anderen Körperflüssigkeiten von Männern nachgewiesen werden. Diese bilden bei bakterieller Umsetzung und je nach Zusammensetzung besonders beim Schweiß einen charakteristischen Geruch (Pause 2004). Ob die Sensitivität des olfaktorischen Systems der Frau auf diese Steroide zyklusabhängig ist, ist nicht eindeutig geklärt (Pause 2004). Frauen geben über den Urin hingegen Östrogenderivate ab (Savic et al. 2005). Spuren davon könnten ebenfalls als Pheromon wirken. Besonders beim Menschen spielt der direkte nasale Kontakt zu den Pheromonen eine untergeordnete Rolle, daher werden vermutlich vorwiegend volatile Sexualsteroidderivate genutzt.

Die Pheromonfunktion dieser Steroide wurde durch MRT-Studien von Savic und Kollegen weiter spezifiziert und Gehirnarealen zugeordnet. Die für das Sexualverhalten wichtigen Anteile des Hypothalamus (wie z. T. die Area preoptica) von heterosexuellen Frauen und homosexuellen Männern sprechen deutlich auf Androstadienon an (Savic et al. 2005). Heterosexuelle Männer und homosexuelle Frauen reagieren dagegen deutlich auf Estratetraenol als Östrogenderivat (Berglund et al. 2006).

Die Existenz von Steroidrezeptoren zusätzlich zu V1R im VNO weisen auf die umfangreichen Funktionen von Steroiden im VNO hin (Cherian et al. 2014).

2.3.3 Generelle Wirkungsmechanismen auf molekularer Ebene

Lipophile Substanzen, die über das VNO aufgenommen werden, gelangen meist gebunden an spezielle Bindeproteine zum SE, wohingegen hydrophile Moleküle die Bindeproteine nicht benötigen (Liberles 2014). Generell können Liganden entweder an membranassoziierte Rezeptoren binden oder sie diffundieren durch die Membran, um an zytosolische Rezeptoren zu binden. Membranassoziierte Rezeptoren sind vorwiegend an (beispielsweise durch Releaser-Pheromone ausgelöst) schnellen Verhaltensantworten beteiligt. Nach der Ligandenbindung kann durch solche Rezeptoren eine Signalkaskade, z. B. über second messenger, in Gang gesetzt werden, die innerhalb von Sekunden bzw. Minuten die Verhaltensantwort auslöst (Bigiani et al. 2005).

Besonders lipophile Moleküle wie Steroide sind in der Lage, ohne weitere Transportmechanismen durch Membranen zu diffundieren. Steroide werden anschließend von zytosolisch vorkommenden klassischen nukleären Rezeptoren gebunden (Ordonez-

Moran und Munoz 2009). Der Rezeptor gelangt mit seinem gebundenen Liganden in den Nukleus und dimerisiert häufig mit einem weiteren Rezeptor. Das Dimer bindet an die DNA und löst eine Transkription aus (Ordenez-Moran und Munoz 2009). Über diesen Weg finden langsame Reizantworten auf Stimuli, die das VNO erreichen, statt – meist treten diese erst nach Stunden oder Tagen auf, wie nach der Detektion von Primer-Pheromonen. So kann ein und derselbe Ligand eine schnelle über second messenger oder eine langsamere auf Transkriptionsebene stattfindende Reaktion auslösen, je nachdem ob er an membranassoziierte oder zytosolische Rezeptoren bindet (Simoncini und Genazzani 2003, Bjornstrom und Sjöberg 2005, Foradori et al. 2008). Die genauen Mechanismen im VNO selbst sind allerdings bisher kaum verstanden. Diese Arbeit soll dazu beitragen, ein Schema der schnellen molekularen Antwort auf Steroide im VNO zu entwickeln.

2.4 Steroidbindungsglobuline im Vomeronasalorgan

Es konnten bereits einige Bindungsglobuline für Steroide im olfaktorischen System inklusive des VNOs nachgewiesen werden. So wird Transcortin (CBG) sowohl im olfaktorischen Epithel als auch im SE und in einzelnen Zellen des NSEs des VNOs der Ratte exprimiert (Dolz et al. 2013). CBG transportiert Glucocorticoide und Progesteron im Blut und hat eine sehr hohe Affinität zu Cortisol. Das CBG bindet vermutlich auch vom VNO aufgenommene Corticosteroide. Cortisol z. B. wirkt als Stresshormon und Alarmpheromon und könnte nach diesen Ergebnissen auch über das VNO wahrgenommen werden. Alarmpheromone haben eine große Bedeutung bei der Räuber-Beute-Beziehung und der Warnung von Artgenossen. Wüstenrennmäuse meiden beispielsweise Areale, die durch Alarmpheromone kontaminiert sind, wohingegen Katzen diese Gerüche zu präferieren scheinen (Cocke und Thiessen 1986). Auch Menschen nehmen Stresshormone über das olfaktorische System wahr (Mujica-Parodi et al. 2009). Welche Derivate der Corticosteroide genau dabei eine Rolle spielen, ist nicht sicher geklärt (Caldwell und Jirikowski 2013) – potentiell könnte aber auch Cortisol beteiligt sein. Da der Glucocorticoid-Rezeptor im VNO nicht nachweisbar ist, werden Corticosteroide primär ihre Funktionen über das CBG vermitteln und so schnelle, wahrscheinlich membranspezifische Antworten (eventuell über einen anderen membranassoziierten Rezeptor) auslösen (Caldwell und Jirikowski 2013).

Ein ähnliches morphologisches Verteilungsmuster im VNO und im restlichen olfaktorischen System wurde für das sexualhormonbindende Globulin (SHBG) gefunden. SHBG bindet sowohl Androgen- als auch Östrogenderivate und ist primär für den

Transport dieser über das Blut verantwortlich. SHBG tritt ebenfalls in den vomeronasalen Drüsen, im SE und in einzelnen Zellen des NSEs im VNO der Ratte auf und wird von diesen Zellen selbst exprimiert (Ploss et al. 2014a, Ploss et al. 2014b). Geschlechtsspezifische Unterschiede wurden nicht festgestellt. Es ist anzunehmen, dass das SHBG Sexualsteroidderivate im olfaktorischen System, die vermutlich auch Pheromonfunktionen haben und aerosolisch oder über direkten Kontakt in den vomeronasalen Gang gelangen, bindet. Der genaue molekulare Mechanismus ist bisher nicht geklärt.

2.5 Neurosteroid

Neurosteroid sind Steroidhormone, die genomische Antworten auslösen oder innerhalb von Sekunden oder wenigen Minuten das Zentralnervensystem beeinflussen können. Diese können auch im Gehirn und peripheren Nervensystem selbst produziert werden (Wojtal et al. 2006), wie am zuerst durch Baulieu beschriebenen Neurosteroid Dehydroepiandrosteron-Sulfat gezeigt wurde (Robel und Baulieu 1995, Baulieu und Robel 1996). Das in der Leber synthetisierte Cholesterol dient vorwiegend als Ausgangsstoff für die Synthese dieser Steroide und wird über das Lipoprotein LDL zu den Zielorganen wie Steroidsyntheseorten transportiert. Neuronal aktive Steroide können in den peripheren endokrinen Drüsen produziert und anschließend z. B. zum Gehirn transportiert werden. Diese bezeichnet man speziell als neuroaktive Steroide (Do Rego et al. 2012). Neurosteroid im engeren Sinn werden im Gehirn selbst aus Cholesterol oder Steroidvorstufen produziert (Do Rego et al. 2012). Damit gehören Neurosteroid und ihre Vorstufen wie die klassischen Steroide zu den lipophilen Substanzen, die frei durch Membranen und auch die Blut-Hirn-Schranke diffundieren können (Baulieu und Robel 1990). Testosteron, Deoxycorticosteron und Progesteron und ihre Derivate, wie beispielsweise auch das Estradiol, welches durch die Aromatase aus Testosteron umgewandelt wird, zählen zu den bekannten Vertretern der Neurosteroid (Reddy 2010). So wurden Progesteron und Progesteronrezeptoren beispielsweise in Gliazellen des peripheren und zentralen Nervensystems gefunden (Baulieu et al. 2001).

Die Neurosteroid wirken entweder über die klassischen Steroidrezeptoren (Rupprecht et al. 1996), wie beispielsweise Progesteron die Bildung von Myelinproteinen über den Progesteronrezeptor beeinflusst (Baulieu und Robel 1990), oder auf membranständige Neurotransmitter-Rezeptoren. Zu diesen gehören u. a. *N*-Methyl-D-Aspartat(NMDA)- und γ -Aminobuttersäure GABA_A-Rezeptoren. GABA_A ist ein inhibitorischer Chloridkanal, der

sich nach Bindung von Progesteronderivaten öffnet, die Zelle hyperpolarisiert und damit hemmt (Plassart-Schiess und Baulieu 2001). Pregnenolon und Dehydroepiandrosteron als weitere Neurosteroiden verstärken die Wirkung des NMDA-Rezeptors und verursachen so einen erhöhten intrazellulären Calciumspiegel – ein Effekt, der das Wachstum von Axonen fördert (Wojtal et al. 2006). Dehydroepiandrosteron-Sulfat hingegen schützt Nervenzellen vor einer NMDA- oder colchizininduzierten Toxizität und den Hippocampus vor glutamatinduzierter Toxizität. Progesteron stimuliert bei Ratten nach einer Verletzung des Rückenmarks das Wachstum von Nervengewebe (Labombarda et al. 2002). Neurosteroiden können damit im Nervensystem auch neuroprotektive Funktionen übernehmen (Wojtal et al. 2006) und einige, wie Pregnenolon-Sulfat oder Dehydroepiandrosteron-Sulfat, sogar die Erinnerungsfähigkeit verbessern.

Progesteron- und Deoxycorticosteronderivate wirken neben der neuroprotektiven Funktion über den GABA_A Rezeptor angstmindernd, stressreduzierend und entspannend (Majewska 1992). Pregnenolon-Sulfat oder Dehydroepiandrosteron-Sulfat dagegen angstfördernd (Reddy 2010). Die Konzentration von Neurosteroiden im Gehirn variiert nachweisbar in Abhängigkeit von Verhaltensänderungen, Stress, Fortpflanzungs- oder Territorialverhalten (Baulieu et al. 2001) und bietet eine Möglichkeit zur therapeutischen Anwendung bei der Behandlung von Angststörungen, Stress, Depressionen und Epilepsie (Reddy 2010).

Auch Vitamin D ist als Neurosteroid bekannt. Der Vitamin D-Rezeptor (VDR) wurde u. a. im Hippocampus, Hypothalamus, Thalamus und präfrontalen Cortex gefunden (Eyles et al. 2005, Bolde et al. 2017). Vitamin D wird vermutlich in Neuronen und Gliazellen synthetisiert, ist an Zelldifferenzierungsprozessen und der Gehirnentwicklung beteiligt und hat wie andere Neurosteroiden neuroprotektive Funktionen (Kiraly et al. 2006, Kalueff und Tuohimaa 2007). In diesem Zusammenhang spielt beispielsweise der Mangel von Vitamin D bei saisonalen Verstimmungen, Depressionen und anderen psychischen Erkrankungen auch eine Rolle (Kiraly et al. 2006, Berk et al. 2007, Zhang und Naughton 2010). Eine Pilotstudie zeigte, dass die Supplementierung von Vitamin D die Cortisolkonzentration im Urin senkt – vermutlich reduziert Vitamin D auch die hormonelle Stressantwort (Al-Dujaili et al. 2016).

2.6 Vitamin D

Vitamin D zählt biochemisch zu den Secosteroiden, einer steroidverwandten Gruppe mit einem geöffneten B-Ring (Norman 2012). Die Gruppe des lipophilen Vitamin D umfasst mehrere Derivate, die u. a. eine wichtige Rolle bei der Steuerung des Calcium- und Phosphat-Haushaltes (Bouillon und Suda 2014), der Aktivierung von T-Zellen des Immunsystems, der Funktion des Nervensystems (Garcion et al. 2002), der Entwicklung des Gehirns (Pet und Brouwer-Brolsma 2016) und der Differenzierung von Epithelzellen der Haut spielen. Auf Grund seiner Funktionen, die über die Wirkung als Cofaktor bzw. Coenzym hinausgehen, wirkt Vitamin D entgegen der historischen Meinung nicht als Vitamin, sondern viel mehr als Hormon.

2.6.1 Biosynthese und Derivate von Vitamin D

Der Mensch nimmt nur etwa 10 - 20 % des Vitamin Ds in Form von Cholecalciferol über die Nahrung auf. Die größte Menge wird ausgehend von einer Cholesterinvorstufe im Körper selbst gebildet (Mithal et al. 2009). Eine zu geringe Phosphat- bzw. Calciumkonzentration im Körper und der Einfluss des Parathormons aus den Nebenschilddrüsen kann die Bildung zusätzlich anregen.

Die körpereigene Synthese beginnt mit dem Provitamin 7-Dehydrocholesterol, welches in hohen Konzentrationen in den Blutgefäßen der untersten Epidermisschichten vorkommt. Über UV-B-Strahlung (abhängig von der Wellenlänge und mit dem Reaktionsmaximum bei 297 nm) wird der B-Ring zwischen C-9 und C-10 durch eine fotochemisch induzierte Reaktion gespalten. Dabei entsteht das chemisch instabile Prävitamin D₃, welches durch Isomerisierung zu Cholecalciferol umgewandelt wird (Lehmann und Meurer 2010).

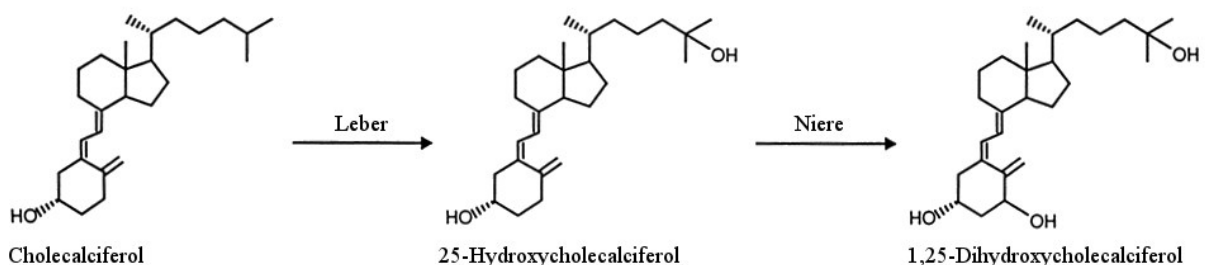


Abb. 4: Umwandlung des Cholecalciferols in das biologisch aktive 1,25-Dihydroxycholecalciferol (Calcitriol) (aus Jones et al. 1998).

Cholecalciferol wird nach seiner Bildung in der Haut durch Transportproteine wie das Vitamin D-bindende Protein (DBP) über den Blutkreislauf zur Leber transportiert (Jones et al. 1998). Teilweise kann Vitamin D im Fettgewebe über mehrere Wochen gespeichert werden, teilweise wird es in den Mitochondrien der Hepatozyten weiter umgewandelt und dafür zunächst an C-25 hydroxyliert (Abb. 4). Es entsteht das noch biologisch inaktive 25-Hydroxycholecalciferol. Am DBP wird dieses weiter zu den Nieren transportiert. Sobald die Calciumkonzentration im Blut sinkt, wird über eine weitere Hydroxylierung durch die 1α -Hydroxylase 25-Hydroxycholecalciferol zu der hormonell aktiven Form $1\alpha,25$ -Dihydroxycholecalciferol (Calcitriol) umgewandelt (Jones et al. 1998). Calcitriol hemmt wiederum durch negative Rückkopplung die Funktion der 1α -Hydroxylase und aktiviert die 24-Hydroxylase, die das aktive Vitamin D wiederum inaktivieren kann (Armbrecht et al. 1998). Calcitriol ist die aktivste Form des Vitamin D und vermittelt die hormonellen Funktionen wie z. B. im Calciumhaushalt.

2.6.2 Der Vitamin D-Rezeptor

Der zur Superfamilie der nukleären Rezeptoren zugehörige VDR ist in verschiedensten Geweben vertreten, die für die vielfältigen Funktionen des Vitamin D eine Rolle spielen (Yamada et al. 2003b, Wang et al. 2012). Der VDR wird besonders in den distalen Nierentubuli, Osteoblasten, Bronchi und im Darmepithel exprimiert und in den meisten Geweben durch den systemischen Vitamin D-Spiegel hochreguliert (Wang et al. 2012). Der VDR bindet Calcitriol mit der höchsten Affinität, kann aber auch andere Vitamin D-Derivate binden (Huhtakangas et al. 2004).

2.6.2.1 Genomische Wirkungsmechanismen

Vitamin D-Derivate diffundieren als lipophile Substanzen durch die Zellmembran und binden anschließend im Zytosol an den nukleären VDR (VDRn), um in den Zellkern zu wandern. Sie bilden im Zellkern entweder Homodimere oder zusammen mit dem Retinoid-X-Rezeptor Heterodimere (Yang et al. 2012). Diese sind in der Lage, innerhalb einer spezifischen Promotorregion am VDRE (vitamin D-responsive element) zu binden, um eine Transkription auszulösen (Haussler et al. 1998, Yamada et al. 2003a). Über diesen klassischen genomischen Weg werden Entwicklungsprozesse, Zelldifferenzierungen oder –proliferationen reguliert (Norman et al. 1992).

2.6.2.2 Nicht-genomische Signalwege

Seit den 80er Jahren ist ein weiterer Wirkungsmechanismus von Steroiden bekannt. Innerhalb von Sekunden oder wenigen Minuten können Steroide Wirkungen auslösen, die auf Grund der Geschwindigkeit nicht über den genomischen Mechanismus ablaufen können. Calcitriol und Vorstufen des Cholecalciferols können solche nicht-genomischen Effekte auslösen (Norman et al. 1993). Das Stereoisomer zu Calcitriol 1 β ,25-Dihydroxycholecalciferol wirkt bei den bisher untersuchten nicht-genomischen Signalwegen des Vitamin D als Antagonist. Bei diesen Mechanismen wird die Beteiligung eines membranständigen VDRs (VDRm) vermutet (Norman et al. 2004, Yang et al. 2012). Solche membranständigen Rezeptoren konnten bereits bei anderen Steroiden nachgewiesen werden. Dazu zählen der Androgenrezeptor (der zur Familie der Kernrezeptoren gehört) in Membranen der Oocyten beim Krallenfrosch *Xenopus laevis* (Lutz et al. 2003) oder der Östrogenrezeptor ER β in Caveolen (Chambliss et al. 2002). VDRm konnte bereits in Caveolen kolokalisiert mit dem für Caveolen typischen Markerprotein Caveolin-1 demonstriert werden (Abb. 5). Weder die genaue Lokalisation membranassoziierter Rezeptoren noch die Art des Rezeptors sind bisher geklärt (Huhtakangas et al. 2004). Es kann sich um den klassischen Kernrezeptor selbst handeln oder um ein strukturell sehr nah verwandtes Protein. Calcitriol kann auf Grund seiner flexiblen molekularen Struktur als 6-s-cis und 6-s-trans Konformation sowohl an den nukleären als auch an den membranassoziierten Rezeptor binden (Norman et al. 1997).

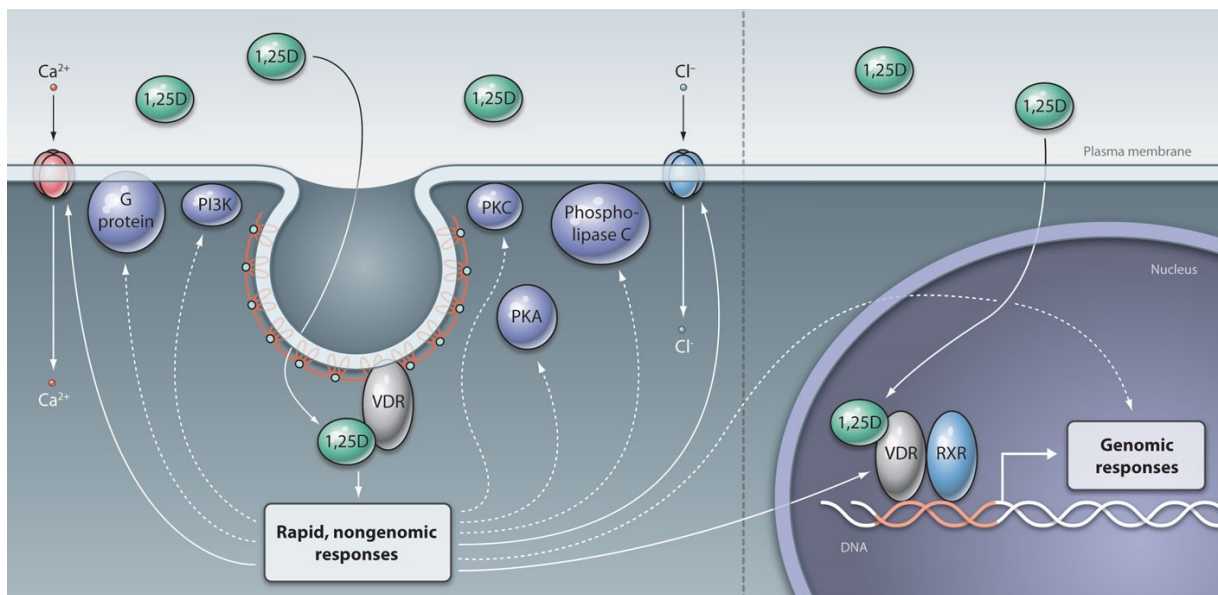


Abb. 5: Calcitriol(1,25D)-Aufnahme in Caveolen über einen membranassoziierten VDR initiiert schnelle, nicht-genomische Effekte. Alternativ kann Calcitriol frei durch die Membran diffundieren und an den nukleären VDR binden, um eine genomische Antwort auszulösen. (aus Mizwicki 2009)

Norman et al. postulierten in dem „conformational ensemble“-Modell drei VDR-Spezies: Einen Rezeptor mit aktivierter „genomischer Bindestelle“ für den klassischen genomischen Signalweg, einen mit aktivierter „alternativer Bindestelle“, die Agonisten der schnellen Steroidantwort bindet und einen Rezeptor, der beide Konfigurationen annehmen kann (Norman et al. 2004, Mizwicki und Norman 2009, Haussler et al. 2011). Nach diesem Modell hat das 6-s-cis-Calcitriol die höchste Affinität zur alternativen Bindestelle und die 6-s-trans-Form zur genomischen Bindestelle. Die Assoziation des nukleären Rezeptors mit der Membran verursacht vermutlich eine Konformationsänderung und damit eine Änderung der Bindungsaffinitäten sowie der Aktivierung der alternativen Bindestelle (Norman et al. 2004). Der weitere Signalweg der nicht-genomischen Antwort kann über Adenylatkinase, Phospholipase C und second messenger, wie beispielsweise Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat und Diacylglycerol verlaufen und resultiert meist in der Öffnung von Calcium- oder Chloridkanälen (Abb. 5) (Ordonez-Moran und Munoz 2009, Hii und Ferrante 2016). Calcitriol reguliert so u. a. die schnelle Aufnahme von Calcium und Phosphat über die Darmwand (Norman et al. 2004) und ist an der Öffnung spannungsgesteuerter Calcium- und Chloridkanäle in Osteoblasten beteiligt (Zanello und Norman 2004). Außerdem stimuliert ein Analogon zu Vitamin D, $1\alpha,25$ -Dihydrolumisterol, die schnelle Insulinsekretion der β -Zellen, wie im Pankreas der Ratte nachgewiesen wurde (Kajikawa et al. 1999).

2.6.3 Das Vitamin D-bindende Protein

Das etwa 52-59 kDa schwere DBP wird vor allem von Hepatozyten synthetisiert und hat im Blutserum eine Halbwertszeit von 2,5 Tagen. Es besteht aus drei Proteindomänen und zwei Ligandenbindestellen: eine für Vitamin D-Derivate und eine weitere für Aktin (Speeckaert et al. 2006). Bisher sind über 120 Varianten des Proteins bekannt. Die häufigsten Phänotypen des DBPs sind Gc-1F, der vorwiegend bei Afroamerikanern und Afrikanern nachgewiesen wurde, und die vermehrt bei Hellhäutigen exprimierten Gc-1S und Gc-2 (Speeckaert et al. 2006).

Bindeproteine wie das DBP dienen vorwiegend dem Transport von lipophilen Substanzen, die nicht ohne weiteres über das Blut transportiert werden können. Im Vergleich zu anderen Steroidbindeproteinen ist DBP in wesentlich größeren Mengen im Blutserum aufzufinden (Cooke und David 1985). Es unterliegt normalerweise auch keinen großen Konzentrationsschwankungen in Abhängigkeit vom Alter oder saisonal bedingten

Schwankungen (Speeckaert et al. 2006). Etwa die 20-fache Menge an DBP im Vergleich zu den Vitamin D-Derivaten befindet sich im Blutserum (White und Cooke 2000).

Daher liegt die größte Menge an Vitamin D im Serum gebunden vor. DBP kann unterschiedliche Vitamin D-Derivate binden, wobei 25-Hydroxycalciferol mit der höchsten Affinität ($K_a = 5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$) und Calcitriol mit einer deutlich geringeren Affinität ($K_a = 4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) bindet (White und Cooke 2000). Die Funktionen von DBP sind nicht ausschließlich auf den Transport von Vitamin D-Derivaten beschränkt (Cooke et al. 1991). DBP besitzt eine Bindestelle für das monomere G-Aktin. Diese Bindung stört das Zusammenlagern der Monomere zum filamentösen F-Aktin. Bei Gewebsverletzungen verhindert DBP zusammen mit dem Protein Gelsolin somit eine Belastung des Blutkreislaufs mit zu großen Mengen an F-Aktin (Bouillon 2011). Diese Funktion und die Stimulation von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen durch DBP (Bouillon 2011) zeigen, dass nicht nur Vitamin D selbst, sondern auch das DBP eine wichtige Rolle für das Immunsystem spielen.

Das DBP kann den Transport von Vitamin D zur und in die Zelle auf unterschiedlichen Wegen vermitteln. Das 25-Hydroxycalciferol gelangt gebunden an DBP zur Zelle, dort diffundiert es frei durch die Membran und wird intrazellulär in Calcitriol umgewandelt, um anschließend an den VDR zu binden (Chun 2012b). Vitamin D kann direkt als Calcitriol gebunden an DBP zur Zielzelle gelangen und anschließend frei durch die Zelle diffundieren. Eine weitere Möglichkeit ist, dass Vitamin D-Derivate gebunden an DBP über eine über den Rezeptor Megalin vermittelte Endozytose in die Zielzelle gelangen. Innerhalb der Zelle löst sich das Vitamin D-Derivat vom DBP in dem Vesikel über Proteolyse, wird frei und bindet anschließend (ggf. wieder nach der Umwandlung in Calcitriol) an VDR, um eine genomische Antwort auszulösen (Chun 2012a). Auch für die Rückresorption von Vitamin D im proximalen Tubulus der Niere spielt Megalin als DBP-bindender Transmembranrezeptor eine wichtige Rolle (Nykjaer et al. 1999).

3 Ziele der Arbeit

Für die Detektion von Pheromonen hat das VNO bei den meisten Säugetierarten eine zentrale Bedeutung. Einige Steroidderivate sind bereits für ihre Wirkung als Pheromone bekannt und können über das VNO detektiert werden. Die Aufnahme von Vitamin D als Secosteroid wurde in diesen Kontext bisher aber kaum betrachtet.

In dieser Arbeit wird die morphologische Verteilung bestimmter Proteine, die für die Aufnahme von Vitamin D eine wichtige Rolle spielen, zunächst im VNO von Ratten und Mäusen des Wildtyps untersucht. Die genaue Lokalisation des DBPs und des VDRs wird über immunhistochemische Arbeitstechniken sowohl im SE als auch im NSE studiert. Über *in-situ*-Hybridisierung und RT-PCR wird eine intrinsische Expression von DBP und VDR im olfaktorischen System überprüft. Vergleichend wird die Verteilung des OMPs in den Zellarten und die genaue Lokalisation in den Zellen beider Epithelien bestimmt.

Das VNO dient damit als Modellorgan, um den Mechanismus der Steroidwahrnehmung zu verstehen und eine Idee der schnellen Steroidwirkung an der Zellmembran zu entwickeln.

Weiterhin wird in einer Pilotstudie untersucht, ob Vitamin D im olfaktorischen System ähnliche Funktionen wie andere Steroide übernimmt. Dabei stellt sich die Frage, ob Vitamin D über das olfaktorische System wahrnehmbar ist und sichtbare Verhaltensänderungen auslösen kann. Die olfaktorische Wirkung des Vitamin D wird an Hunden und Wölfen studiert und dabei auf Verhaltensantworten, die insbesondere nach der Detektion von Pheromonen folgen, geachtet.

4 Publikationen

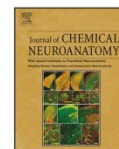
4.1 Publikation I: Distribution of olfactory marker protein in the rat vomeronasal organ

Rodewald A, Gisder D, Gebhart VM, Oehring H, Jirikowski GF. 2016. Journal of Chemical Neuroanatomy, 77:19-23.

Die genauen Funktionen des OMPs sind weitgehend unklar. Üblicherweise wird OMP als Marker für olfaktorisch aktive Zellen genutzt. In dieser Studie wurde OMP durch Immunhistochemie an Semidünnschnitten des VNOs der Ratte lokalisiert. Spezifische Markierungen für OMP wurden zytosolisch in den Dendriten, den Axonen und den Perikarya der Neurone selbst und in den olfaktorischen Zilien des SEs gefunden. Auch das NSE zeigt Markierungen im Zytosol und teilweise den Zilien einzelner Zellen. Darüber hinaus ist OMP in den sekretorischen Vesikeln einiger vomeronasaler Drüsen und teilweise den apikalen Mikrovilli dieser angereichert. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten die strukturellen Eigenschaften des NSEs auf. Im basalen Bereich einiger Zellen im NSE liegen Axone in enger Nachbarschaft. Diese Zellen sind reich an Vesikeln und besitzen auf der apikalen Seite Zilien und Mikrovilli. Die OMP-positiven sekretorischen Vesikel der vomeronasalen Drüsen dienen sehr wahrscheinlich der Exkretion und können das OMP in das Lumen des VNOs ausschütten. OMP könnte eine wichtige Rolle bei der olfaktorischen Wahrnehmung spielen, die nach bisheriger Ansicht ausschließlich im SE stattfinden soll. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass nicht nur das SE OMP-spezifische Funktionen hat. Die OMP-positiven Zellen im NSE könnten ebenfalls sensorische Funktionen im VNO übernehmen und spielen dabei eventuell auch eine Rolle bei der Pheromondetektion.

Eigenanteil:

- Planung und Durchführung der immunhistochemischen Versuche
- mikroskopische Auswertung
- Literaturrecherche
- Verfassung des Manuskripts



Distribution of olfactory marker protein in the rat vomeronasal organ



A. Rodewald*, D. Gisder, V.M. Gebhart, H. Oehring, G.F. Jirikowski

Institute of Anatomy II, University Hospital Jena, Friedrich Schiller University, Jena, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 February 2016

Received in revised form 7 April 2016

Accepted 7 April 2016

Available online 13 April 2016

Keywords:

Vomeronasal organ

Sensory neurons

Non-sensory epithelium

Olfactory marker protein

Vomeronasal glands

Immunohistochemistry

Electron microscopy

ABSTRACT

Olfactory marker protein (OMP) may act as a modulator within the olfactory signal-transduction cascade. It has also been shown to have some importance in development of olfactory sensory organs. Here we used high resolution immunocytochemistry to localize OMP in the rat vomeronasal organ (VNO). Immunofluorescence for OMP was abundant in cilia and in apical dendrites of sensory cells, mostly associated with intraepithelial capillaries. Perikarya were stained to a lesser extent while intense OMP immunoreactivity was seen in axons of sensory neurons. Single cells within the non-sensory portion of the VNO exhibited intense OMP immunofluorescence in apical cilia and weak cytoplasmic staining. Some of the exocrine cells in the vomeronasal glands contained OMP positive secretory granules. Electron microscopy revealed that non-sensory ciliated cells had short rod like kinocilia as well as microvilli. These cells contained secretory vesicles. Their basal portion was in close apposition to nerve endings. Our findings suggest that the sensory part of the VNO contains OMP positive sensory neurons and that the non-sensory epithelium may contain secondary sensory cells. In addition OMP may be liberated from secretory glands into vomeronasal secretions.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Olfactory marker protein (OMP) is a 19 kDa protein that is known to specifically occur in olfactory sensory neurons (Bock et al., 2009; Farbman and Margolis, 1980; Fleischer et al., 2006; Graziadei et al., 1980; Margolis, 1972; Wensley et al., 1995). OMP is widely used as a molecular marker for olfactory neurons in both the olfactory mucosa and the sensory portion of the vomeronasal organ (VNO) in different species (Barrios et al., 2014a,b; Berghard et al., 1996; Sasuga et al., 2013; Smith et al., 2011). The functional properties of OMP are still a matter of controversy. It has been shown to play a critical role in olfaction (Buiakova et al., 1996). OMP may also have some importance for postnatal development of mother preference (Lee et al., 2011), for maturation of olfactory neurons and for the level of selectivity in stimulus-response (Buiakova et al., 1996). Recent observations indicate that OMP is not confined to olfactory neurons since it has been described also in a few tissues unrelated to the olfactory system (Kang et al., 2015).

The vomeronasal duct forms the center of the VNO. Its medial portion is lined by the sensory epithelium (SE) which contains

sensory neurons, basal cells, supporting cells, sustentacular cells (Barrios et al., 2014a) and intraepithelial capillaries (Breipohl et al., 1981). Sensory neurons extend their olfactory cilia into the lumen. They are surrounded by cells which have longer microvilli (Hofer et al., 2000; Dennis et al., 2003). Laterally the duct is lined by 'non-sensory epithelium' (NSE) characterized by four cell types: Dark, light and pale non-ciliated cells, as well as ciliated columnar cells (Elgayar et al., 2014). The NSE is closely associated with one or two large vomeronasal veins (Doving and Trotter, 1998). Vomeronasal glands are located in the submucosal layer of the NSE, their excretory ducts feed into the vomeronasal duct (Adams and Wiekamp, 1984; Doving and Trotter, 1998).

In most mammals the VNO is known to play an important role in chemical communication (Achiraman et al., 2010; Barrios et al., 2014b; Jacobson et al., 1998). It is likely to be the primary target of pheromones thus triggering social behaviors including sexual arousal and stress response (Clancy et al., 1984; Holy et al., 2000; Leypold et al., 2002; Luo and Katz, 2004). The underlying molecular mechanisms are still far from being understood. Recently we observed the expression of sex hormone binding globulin and of corticosteroid binding globulin in the rat olfactory epithelium, in the VNO and in the olfactory bulbs (Dolz et al., 2013; Ploss et al., 2014a,b).

The current immunohistochemical study seeks to examine the distribution of OMP in the rat VNO in greater detail. Electron

Abbreviations: NSE, non-sensory epithelium; OMP, olfactory marker protein; SE, Sensory epithelium; VNO, Vomeronasal organ.

* Corresponding author at: Universitätsklinikum Jena, Institut für Anatomie II, Teichgraben 7, 07743 Jena, Germany. Tel.: +49 3641 938553; fax: +49 3641 938552.

E-mail address: Andrea.Rodewald@med.uni-jena.de (A. Rodewald).

microscopy was employed to study ultrastructural features of the various cell types in SE and NSE.

2. Materials and methods

2.1. Tissue preparation

All animal experiments were performed in accordance with German law. Protocol was approved by Thuringian state government (# 02-040/40). Tissue preparation was performed as described before (Ploss et al., 2014b). Briefly, wistar rats (adult males $n=3$, adult females $n=2$) were killed by prolonged ether anesthesia followed by cardiac perfusion with 4% paraformaldehyde in PBS (0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.2, containing 0.9% NaCl). Tissue samples containing the VNO were rapidly dissected and postfixed in the same fixative prior to dehydration through ascending ethanol series and embedded in EPON 812 (Ferak, Berlin, Germany). 1 μ m serial sections were cut on a Reichert Ultracut microtome, collected on APES-coated glass slides (Thermo Scientific, Braunschweig, Germany) and air dried.

2.2. Immunohistochemistry

For immunohistochemistry epoxy resin was removed by incubation in 10% sodium methoxide, methanol/benzene 1:1 and 2 \times in acetone 2 min each. Thereafter sections were rinsed in PBS. To block non-specific reactions the sections were preincubated in 2% normal donkey serum diluted in PBS at room temperature (RT) for 30 min. After washing in PBS sections were incubated with goat anti-OMP (Wako chemicals, USA) diluted 1:500 in PBS in a humid chamber at 4 °C overnight. Controls were performed with normal goat serum instead of the specific antibody. After rinsing in PBS sections were incubated in the dark with donkey Alexa Fluor 568 labeled anti-goat IgG (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) diluted 1:200 in PBS at RT for 60 min. After washing in PBS sections were incubated in the dark with nuclear stain (Hoechst) diluted 1:1000 in PBS at RT for 15 min. For immunoperoxidase staining we incubated sections that had been treated with the anti OMP as described above with anti-goat IgG (Sigma Aldrich, Munich, Germany) 1:200 in PBS at RT for 60 min. After washing in PBS sections were incubated with Peroxidase-anti-peroxidase complex (goat-PAP, Sigma Aldrich, Munich, Germany) diluted 1:200 in PBS at RT for 60 min. Immunoprecipitates were stained with DAB and H₂O₂ for 5 min (FAST kit, Sigma Aldrich, Munich, Germany). Stained sections were rinsed in PBS and mounted with either aqueous mounting medium Mowiol® (AppliChem, Darmstadt, Germany) or, after dehydration through ascending ethanol series and clearing in xylene, with Entellan® (Merck, Darmstadt, Germany). Analysis of the sections was performed with an Olympus BX 50 microscope equipped with epifluorescence illumination (filter combinations WU and WG) and with interference contrast optics. An Olympus DP10 camera was used for microphotography.

2.3. Electron microscopy

Tissue samples containing the VNO were obtained from perfusion fixed rats as described above. After repeated rinsing in 0.1 M cacodylate buffer specimen were fixed with 2% glutaraldehyde (0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4, 5% sucrose) for 30 min at 20 °C. Subsequently tissue samples were rinsed in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4, 6.8% sucrose) and postfixed with a freshly prepared mixture of 2% osmium tetroxide (in ddH₂O) and 3% potassium ferrocyanide (0.2 M cacodylate, pH 7.4) for 2 h at 4 °C. Thereafter specimen were washed thoroughly in 0.1 M cacodylate solution (pH 7.4) until the solution remained clear. (All chemical obtained

from Sigma-Aldrich, Munich, Germany) Tissue samples were dehydrated in graded ethanol series and embedded in EPON 812 (Ferak, Berlin, Germany) via acetonitrile as intermedium. Tissue blocks were polymerized at 60 °C for one week. Ultrathin sections (70 nm) prepared with low angle diamond knives (DIATOME, Biel, Switzerland) were mounted on Formvar coated H9 SPEC Cu copper grids (Science Services, Munich, Germany) and stained with 1% uranyl acetate (in methanol) and freshly prepared lead citrate (25 mg/10 ml distilled water). Sections were examined with an EM 902 (ZEISS, Oberkochen, Germany) with an accelerating current of 80 KV.

3. Results

3.1. Sensory epithelium

Sensory cells of the VNO extended long dendrites which terminated in olfactory knobs and olfactory cilia. Dendrites were surrounded by supporting cells and by small capillaries. OMP immunostaining was found in olfactory cilia and in dendrites of sensory neurons (Fig. 1). The perinuclear cytoplasm of most of these cells showed OMP immunofluorescence (Fig. 2). Axons of sensory cells were seen in the submucosal layer, they were also specifically immunostained. Higher magnifications of the apical portion of the SE revealed that the superficial layer consisting mostly of supporting cell microvilli and of olfactory cilia contained the most intense OMP immunofluorescence. Some of the OMP positive dendrites were in close apposition to intraepithelial capillaries (Fig. 3). Sensory cell nuclei, cytoplasm of supporting cells and of basal cells were OMP-negative. The results showed no significant sex differences. Controls did not show any specific staining in SE.

3.2. 'Non-sensory' epithelium

The squamous epithelium lining the NSE consists of ciliated and non-ciliated cells interposed by scattered goblet cells. A small portion of these ciliated cells appeared to be narrow and cone shaped. They contained small OMP positive cytoplasmic granules

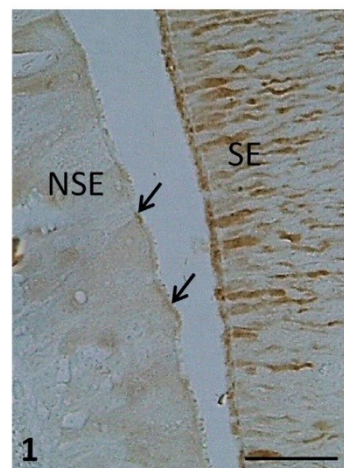


Fig. 1. Immunoperoxidase staining for OMP in the rat VNO. Apical dendrites of sensory cells within SE show specific immunoreactivity (brown precipitation). Cilia of single cells in the NSE are OMP positive (arrows). Scale bar = 10 μ m.

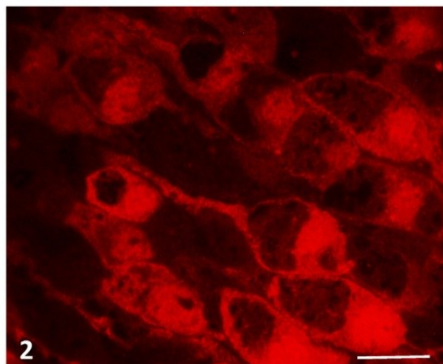


Fig. 2. OMP immunofluorescence in sensory cells of the SE. OMP-staining is confined to the perinuclear cytoplasm and to dendrites. Scale bar = 5 μ m.

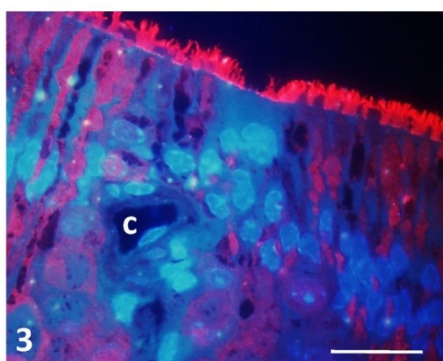


Fig. 3. Apical part of the SE. Dendrites and sensory microvilli show OMP immunofluorescence. Some of the dendrites are in close apposition to intra-epithelial capillaries (arrow, C). Nuclei of supporting cells and of endothelial cells are stained with Hoechst nuclear stain. Scale bar = 5 μ m.

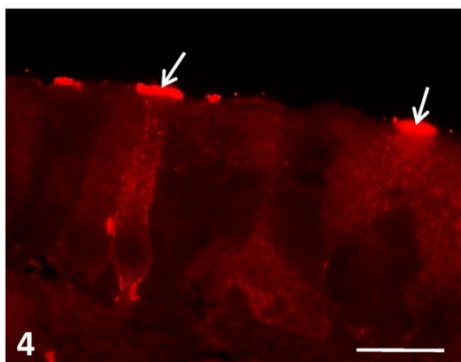


Fig. 4. OMP immunofluorescence in single ciliated cells within the NSE. Apical cilia show intense immunofluorescence (arrows). These cells contain also granulated OMP labeling fluorescence within the perinuclear cytoplasm. Scale bar = 5 μ m.

while their cilia showed intense OMP immunofluorescence (Fig. 4) and immunoperoxidase staining (Fig. 1). A portion of the secretory cells within the vomeronasal glands showed large OMP positive granules (Fig. 5). Some of the ciliated epithelial cells lining the excretory ducts exhibited OMP positive cilia similar to the cells observed in the NSE (Fig. 6). Also in NSE no difference can be observed between males and females. Here again the OMP positive cells remained unstained in the controls.

3.3. Ultrastructural findings

Epithelial cells of the NSE extended long kinocilia into the vomeronasal duct. Narrow ciliated cells with morphological features of the OMP positive NSE cells showed only short, rod like kinocilia which were interposed by microvilli. They contained numerous mitochondria. These cells held in their apical portion dense cored secretory vesicles with a mean diameter of 150 nm (Fig. 7). Vesicle containing ciliated cells showed in their basal portions connections to non-myelinated neuronal projections (Fig. 8). Axonal cross sections were identified by their content of neurofilaments and neurotubules.

4. Discussion

OMP has been described in sensory neurons of both the olfactory mucosa and the SE of the VNO (Bock et al., 2009; Farbman and Margolis, 1980; Fleischer et al., 2006). Little is known about the functional properties of OMP at present. Clearly the importance of OMP should exceed that of a histochemical marker. OMP may be important for binding olfactory ligands (Buiakova et al., 1996) but also for development and regeneration of the olfactory neurons and their projections to the olfactory bulbs (Lee et al., 2011). We observed OMP in the perinuclear cytoplasm of sensory cells, in their apical dendrites and in axonal projections. It is likely that neuronal OMP is subject to axonal transport since colchicine treatment resulted in loss of axonal immunostaining and generation of cytoplasmic inclusion bodies (Ploss et al., 2014a). The SE is one of the few epithelia vascularized by numerous capillaries. The importance of dendritic appositions to bloodvessels in the SE and their possible interaction with sustentacular cells has been subject of extensive histochemical and ultrastructural studies (Joiner et al., 2015; Merigo et al., 2011; Strotmann and Breer, 2011).

Recent observations indicate that OMP is not confined to olfactory neurons since it has been described also in a few tissues

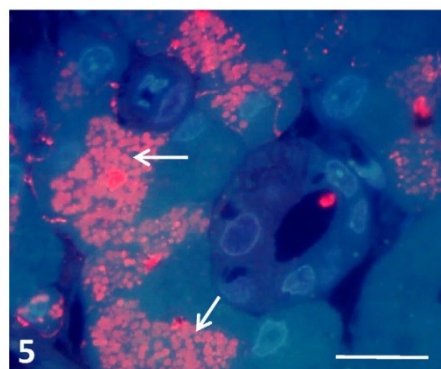


Fig. 5. OMP immunofluorescence is visible in secretory granules in some of the exocrine cells of the vomeronasal glands (arrows). Scale bar = 5 μ m.

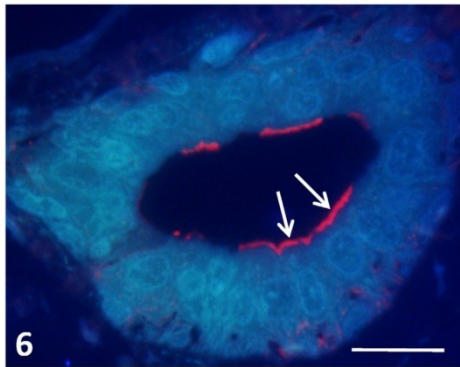


Fig. 6. Epithelial cells lining the excretory ducts of vomeronasal glands show in part OMP positive cilia (arrows). Scale bar = 5 μ m.

unrelated to the olfactory system (Kang et al., 2015). Here we describe possible expression of OMP also in certain cells of the NSE and in cells of the vomeronasal glands. Previous studies that focused on sensory neurons showed also OMP immunostaining in apical parts of single cells in the NSE. Unfortunately the authors did not comment on the stainings shown in mouse (Barrios et al., 2014b). Single OMP positive cells in NSE were seen in newborn Lemurs, a primate species (Smith et al., 2011). OMP was also found in NSE during development in mouse (Berghard et al., 1996; Merigo et al., 2011; Tarozzo et al., 1998). The NSE seems to consist of a rather heterogenous group of cells. Only a small portion of columnar cells showed intense OMP immunofluorescence, suggesting that the marker protein was associated with cilia. In addition these cells exhibited fine granular cytoplasmic OMP immunofluorescence suggesting either biosynthesis or uptake of this protein. Unevenly distributed columnar ciliated cells in NSE have already been described in several studies (Adams and Wiekamp 1984; Breipohl et al., 1979; Ciges et al., 1977; Elgayar

et al., 2014). It has been suspected that such cells may be involved in secretory and vasomotor function of NSE (Ciges et al., 1977). Our electron microscopical observations of large, dense cored vesicles within columnar ciliated cells suggest their secretory properties as assumed by others (Elgayar et al., 2014; Vaccarezza et al., 1981). The close proximity to nerve endings found in the basal portion of columnar ciliated cells further suggests secretory activity. Although we did not perform an immune electron microscopy in this study it seems safe to assume that the single ciliated cells with short rods that contained dense cored vesicles represent the OMP positive NSE cells shown by light microscopical immunohistochemistry. The presence of vesicles suggests that they are capable of secreting their content into the vomeronasal duct. Their possible innervation further suggests that these cells could also have chemoreceptive function. It has been shown that α -gustducin, a marker for gustatory cells, was not detectable in the NSE (Hofer et al., 2000). Since there are several different types of secondary sensory cells, there is still a possibility that OMP positive epithelial cells in the NSE have in fact sensory function.

OMP was observed in large secretory vesicles of some of the exocrine cells within the vomeronasal glands, suggesting liberation of the marker protein into the vomeronasal duct. Immunoassays to prove the presence of OMP in VNO secretions are yet to be performed. Nevertheless it is likely that the intense OMP immunostaining of sensory neuron cilia, of cilia of supporting cells, of sustentacular cells and of certain cells within the NSE and the excretory ducts of glands is actually result of OMP accumulation. Clearly there are distinct populations of ciliated cells that showed OMP staining and which represent only a tiny portion of all non-sensory epithelial cells. Secretions of VNO glands have been shown to facilitate chemoreception of low volatile stimuli (Mendoza and Breipohl, 1983).

Function and distribution of OMP in the VNO may vary depending on species and on age. We propose that at least in the adult rat VNO OMP is not confined to sensory neurons. There may be different sources of OMP: Sensory neurons, columnar ciliated cells and exocrine cells may all express the marker protein. RT-PCR studies have shown the presence of OMP encoding transcripts in the VNO (Sasuga et al., 2013) however the actual

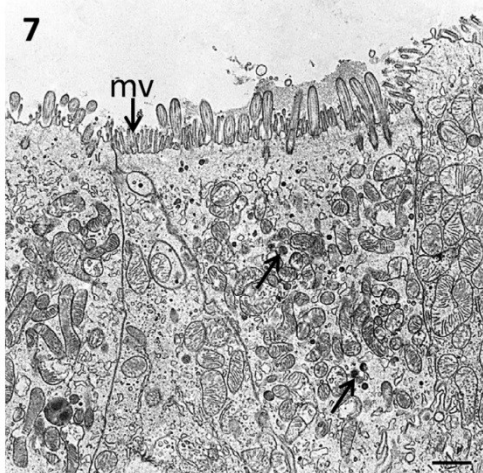


Fig. 7. Electron micrograph of ciliated cells of the NSE. Cells have apical microvilli (mv) and short rod shaped kinocilia. Dense cored secretory vesicles are visible within the apical cytoplasm (open arrows). Scale bar = 500 nm.

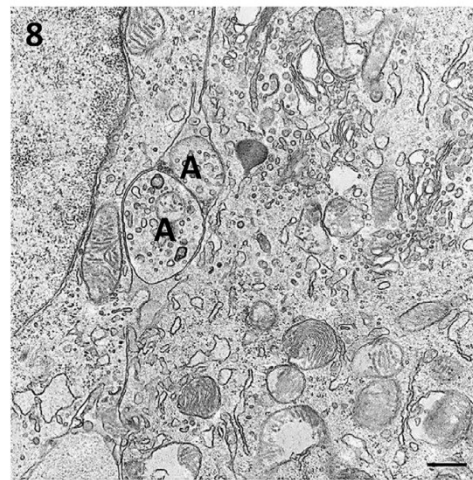


Fig. 8. Electron micrograph of the basal portion of a ciliated NSE cell. Axonal cross-sections (A) are visible closely associated with the cell membrane. Scale bar = 250 nm.

cell type that is capable of OMP biosynthesis still needs to be identified by *in situ* hybridization. Further studies with a higher number of samples are necessary to examine possible sex differences precisely. In case of sensory neurons OMP originating from VNO secretions may bind to the outside of the membrane while intrinsic neuronal OMP is confined to the intracellular side of sensory cilia. This may be of some importance for signal transduction and olfactory perception.

Acknowledgements

The technical assistance of Sabine Hitschke (Immunohistochemistry) and of Isa Lemke (Electron micrographs) is gratefully acknowledged.

References

- Achiraman, S., et al., 2010. Detection of estrus by male mice: synergistic role of olfactory-vomeroneasal system. *Neurosci. Lett.* 477 (3), 144–148.
- Adams, D.R., Wiekamp, M.D., 1984. The canine vomeronasal organ. *J. Anat.* 138 (Pt 4), 771–787.
- Barrios, A.W., et al., 2014a. The nasal cavity of the sheep and its olfactory sensory epithelium. *Microsc. Res. Technol.* 77 (12), 1052–1059.
- Barrios, A.W., et al., 2014b. Anatomy, histochemistry and immunohistochemistry of the olfactory subsystems in mice. *Front. Neuroanat.* 8, 63.
- Berghard, A., et al., 1996. Evidence for distinct signaling mechanisms in two mammalian olfactory sense organs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (6), 2365–2369.
- Bock, P., et al., 2009. Site-specific population dynamics and variable olfactory marker protein expression in the postnatal canine olfactory epithelium. *J. Anat.* 215 (5), 522–535.
- Breipohl, W., et al., 1979. Fine structure of the receptor-free epithelium in the vomeronasal organ of the rat. *Cell Tissue Res.* 200 (3), 383–395.
- Breipohl, W., et al., 1981. Intraepithelial blood vessels in the vomeronasal neuroepithelium of the rat. *Cell Tissue Res.* 215 (3), 465–473.
- Buiaikova, O.I., et al., 1996. Olfactory marker protein (OMP) gene deletion causes altered physiological activity of olfactory sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (18), 9858–9863.
- Ciges, M., et al., 1977. Ultrastructure of the organ of Jacobson and comparative study with olfactory mucosa. *Acta Otolaryngol.* 83 (1–2), 47–58.
- Clancy, A.N., et al., 1984. Sexual behavior and aggression in male mice: involvement of the vomeronasal system. *J. Neurosci.* 4 (9), 2222–2229.
- Dennis, J.C., et al., 2003. Immunohistochemistry of the canine vomeronasal organ. *J. Anat.* 202 (6), 515–524.
- Dolz, W., et al., 2013. Expression of corticosteroid binding globulin in the rat olfactory system. *Acta Histochem.* 115 (4), 376–381.
- Doving, K.B., Trotter, D., 1998. Structure and function of the vomeronasal organ. *J. Exp. Biol.* 201 (Pt 21), 2913–2925.
- Elgayar, S.A., et al., 2014. Morphology of non-sensory epithelium during post-natal development of the rabbit vomeronasal organ. *Anat. Histol. Embryol.* 43 (4), 282–292.
- Farbman, A.I., Margolis, F.L., 1980. Olfactory marker protein during ontogeny: immunohistochemical localization. *Dev. Biol.* 74 (1), 205–215.
- Fleischer, J., et al., 2006. A novel population of neuronal cells expressing the olfactory marker protein (OMP) in the anterior/dorsal region of the nasal cavity. *Histochem. Cell Biol.* 125 (4), 337–349.
- Graziadei, G.A., et al., 1980. The olfactory marker protein in the olfactory system of the mouse during development. *Neuroscience* 5 (7), 1239–1252.
- Hofer, D., et al., 2000. Identification of cytoskeletal markers for the different microvilli and cell types of the rat vomeronasal sensory epithelium. *J. Neurocytol.* 29 (3), 147–156.
- Holy, T.E., et al., 2000. Responses of vomeronasal neurons to natural stimuli. *Science* 289 (5484), 1569–1572.
- Jacobson, L., et al., 1998. Anatomical description of a new organ in the nose of domesticated animals by Ludvig Jacobson (1813). *Chem. Senses* 23 (6), 743–754.
- Joiner, A.M., et al., 2015. Primary cilia on horizontal basal cells regulate regeneration of the olfactory epithelium. *J. Neurosci.* 35 (40), 13761–13772.
- Kang, N., et al., 2015. Olfactory marker protein expression is an indicator of olfactory receptor-associated events in non-olfactory tissues. *PLoS One* 10 (1), e0116097.
- Lee, A.C., et al., 2011. Olfactory marker protein is critical for functional maturation of olfactory sensory neurons and development of mother preference. *J. Neurosci.* 31 (8), 2974–2982.
- Leypold, B.G., et al., 2002. Altered sexual and social behaviors in *trp2* mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (9), 6376–6381.
- Luo, M., Katz, L.C., 2004. Encoding pheromonal signals in the mammalian vomeronasal system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14 (4), 428–434.
- Margolis, F.L., 1972. A brain protein unique to the olfactory bulb. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 69 (5), 1221–1224.
- Mendoza, A.S., Breipohl, W., 1983. The cell coat of the olfactory epithelium proper and vomeronasal neuroepithelium of the rat as revealed by means of the Ruthenium-red reaction. *Cell Tissue Res.* 230 (1), 139–146.
- Merigo, F., et al., 2011. Epithelial membrane transporters expression in the developing to adult mouse vomeronasal organ and olfactory mucosa. *Dev. Neurobiol.* 71 (10), 854–869.
- Ploss, V., et al., 2014a. Sex hormone binding globulin in the rat olfactory system. *J. Chem. Neuroanat.* 57 (–58), 10–14.
- Ploss, V.M., et al., 2014b. Localization of sex hormone binding globulin in the rat vomeronasal organ. *J. Chem. Neuroanat.* 61 (61–62), 120–123.
- Sasuga, S., et al., 2013. Gene expression of bovine vomeronasal receptors. *J. Biol. Sci.* 7, 27–42.
- Smith, T.D., et al., 2011. Olfactory marker protein expression in the vomeronasal neuroepithelium of tamarins (*Saguinus* spp.). *Brain Res.* 1375, 7–18.
- Strotmann, J., Breer, H., 2011. Internalization of odorant-binding proteins into the mouse olfactory epithelium. *Histochem. Cell Biol.* 136 (3), 357–369.
- Tarozzo, G., et al., 1998. Prenatal differentiation of mouse vomeronasal neurones. *Eur. J. Neurosci.* 10 (1), 392–396.
- Vaccarezza, O.L., et al., 1981. The vomeronasal organ of the rat. *J. Anat.* 132 (2), 167–185.
- Wensley, C.H., et al., 1995. Olfactory marker protein mRNA is found in axons of olfactory receptor neurons. *J. Neurosci.* 15 (7 Pt 1), 4827–4837.

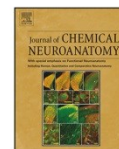
4.2 Publikation II: The rat vomeronasal organ is a vitamin D target

Rodewald A, Gebhart VM, Oehring H, Jirikowski GF. 2017. Journal of Chemical Neuroanatomy, 81:42-47.

Das VNO ist ein Zielorgan für Steroide wie Androgen- und Östrogenderivate, die auch als Pheromone bekannt sind. Die Rolle von Vitamin D als steroidales Pheromon ist bisher kaum untersucht. DBP und VDR spielen bei dem Transport und der Aufnahme von Vitamin D-Derivaten eine Rolle. In dieser Studie wurde über immunhistochemische Techniken, RT-PCR und *in-situ*-Hybridisierung die Verteilung und Expression des VDRs und des DBPs im VNO der Ratte untersucht. Sowohl das SE als auch das NSE zeigen für beide Proteine Markierungen. Der VDR wurde v.a. in den olfaktorischen Zilien, den dendritischen Protrusionen, Perikarya und einzelnen Zellkernen der sensorischen Neurone im SE nachgewiesen, konnte aber auch im Zytosol und besonders in den Zilien einzelner Zellen des NSEs beobachtet werden. Dabei wurde ein membranständiger VDR an den dendritischen Protrusionen gefunden. Das DBP kommt besonders in den dendritischen Vorwölbungen, den Dendriten selbst und im Zytosol der sensorischen Neurone des SEs vor. Es zeigte sich eine starke Kolo-kalisation von DBP und VDR im Zytosol einzelner Zellen des NSEs und den dendritischen Protrusionen der Neurone des SEs. Die granulären Vesikel in den vomeronasalen Drüsen waren DBP-positiv. RT-PCR und *in-situ*-Hybridisierung bestätigten die intrinsische Expression des DBPs und VDRs im VNO der Ratte. Das DBP kann über die Vesikel aus den vomeronasalen Drüsen in das vomeronasale Lumen ausgeschüttet werden, wo es aerosolisch aufgenommene Vitamin D-Derivate binden kann. Diese gelangen dann zu den neuronalen Membranen des SEs und vermutlich auch zu einzelnen Zellen des NSEs. Das Vitamin D löst so wahrscheinlich über den membranständigen VDR schnelle nicht-genomische Antworten an den Zellmembranen aus. Einige Vitamin D-Moleküle werden wahrscheinlich auch aufgenommen, binden an intrazellulär vorkommende DBP oder lösen über den nukleären VDR eine genomische Antwort aus.

Eigenanteil:

- Planung und Durchführung der immunhistochemischen Versuche
- Mitarbeit bei der Durchführung der RT-PCR
- mikroskopische Auswertung
- Literaturrecherche und Verfassung des Manuskripts



The rat vomeronasal organ is a vitamin D target

A. Rodewald^{*}, V.M. Gebhart, H. Oehring, G.F. Jirikowski

Institute of Anatomy II, University Hospital, Friedrich Schiller University, Jena, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 November 2016

Received in revised form 21 December 2016

Accepted 30 January 2017

Available online 31 January 2017

Keywords:

Rat vomeronasal organ

Sensory cells

Vitamin D receptor

Vitamin D binding protein

Immunohistochemistry

RT-PCR

ABSTRACT

We studied the expression of vitamin D receptor and of vitamin D binding protein in the rat vomeronasal organ. With immunofluorescence, in situ hybridization and with reverse transcriptase PCR we found both proteins in sensory as well as in non-sensory cells. Sensory neurons contained immunoreactivity for vitamin D3 receptor in nuclei, in portions of the cytoplasm, and in apical dendrites and their microvilli. Vitamin D binding protein was observed in sensory neuron axons and cytoplasm, mostly confined to dendrites. Colocalization appeared in the contact zone of supporting cells and sensory dendrites. Both proteins were also found in single ciliated cells within the non-sensory epithelium. Vitamin D binding protein was also localized in secretory vesicles in a portion of the vomeronasal glands. Our findings suggest that the rat vomeronasal organ is a vitamin D target.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The vitamin D ($1\alpha,25$ -dihydroxycholecalciferol) receptor (VDR) belongs to the family of nuclear steroid receptors (Mangelsdorf et al., 1995). VDR was found in a large variety of tissues with immunocytochemistry, in situ hybridization and with autoradiography (Wang et al., 2012; Yang et al., 2012). The biologically active form of vitamin D, calcitriol (VD3), performs its transcriptional functions through VDR. Several studies documented that VD3 may be a neurosteroid (Harms et al., 2011) important for brain development (Harms et al., 2011; McGrath et al., 2004). VDR was found in the rat olfactory mucosa and olfactory bulb (Glaser et al., 1999). Parts of the hypothalamus and of the limbic system express VDR, in part colocalized with oxytocin (Prufer and Jirikowski, 1997; Prufer et al., 1999) and it has been proposed that VD3 is involved in the control of limbic functions and in human affective disorders (Armstrong et al., 2006; Ganji et al., 2010; Jorde et al., 2006). Almost 90% of serum vitamin D is bound to Vitamin D binding protein (DBP) (Bikle et al., 1986; Speeckaert et al., 2006), a 55 kDa protein that is mostly synthesized and liberated in liver (Speeckaert et al., 2006; Cooke and David, 1985). DBP expression has been shown to occur also in specific regions of the rat brain (Jirikowski et al., 2009).

In mammals the vomeronasal organ (VNO) has been suspected to be the main target of steroid pheromones thus triggering social

behaviors (Clancy et al., 1984; Holy et al., 2000; Leypold et al., 2002; Luo and Katz, 2004). The VNO is located bilaterally at the lower portion of the nasal septum. It hosts the vomeronasal duct (VND) which is medially lined by the sensory epithelium (SE) and laterally by the non-sensory epithelium (NSE). The SE contains sensory neurons, basal cells, supporting cells and intraepithelial capillaries (Barrios et al., 2014; Breipohl et al., 1979; Dennis et al., 2003; Hofer et al., 2000). Sensory neurons extend their dendrites towards the lumen of the VND. They form protrusions that extend microvilli which have been termed knoblike dendritic endings (Hofer et al., 2000) since they share some similarities with the olfactory knobs which host cilia with membrane associated olfactory receptors. The NSE contains several cell types: Dark, light and pale non-ciliated cells, and ciliated columnar cells (Elgayar et al., 2014). Vomeronasal glands are located in the submucosal layer of the NSE, their excretory ducts feed into the VND (Adams and Wiekamp, 1984; Doving and Trotter, 1998). Sensory cells in olfactory mucosa and in the VNO express the olfactory marker protein (OMP) (Bock et al., 2009; Farbman and Margolis, 1980; Fleischer et al., 2006). The functional properties of this 19 kDa protein are still mostly unknown. It is used as a molecular marker for olfactory neurons and their projections in different species (Barrios et al., 2014; Berghard et al., 1996; Smith et al., 2011).

In previous studies we observed the expression of sex hormone binding globulin and of corticosteroid binding globulin in the rat VNO (Dolz et al., 2013; Ploss et al., 2014a, 2014b). We also demonstrated a small OMP-positive group of cells in the NSE (Rodewald et al., 2016). Experiments in lizards indicated that

^{*} Corresponding author at: Institut für Anatomie II, Universitätsklinikum Jena, Teichgraben 7, 07743 Jena, Germany.
E-mail address: Andrea.Rodewald@med.uni-jena.de (A. Rodewald).

provitamin D₃ (7-Dehydrocholesterol) has pheromone like properties (Martin and Lopez, 2006).

The current study seeks to examine the distribution of VDR and DBP in the rat VNO. In situ hybridization with bromodeoxyuridine (BrdU) labelled synthetic oligo nucleotide probes complementary to DBP encoding transcripts and RT-PCR of RNA extracts from tissue homogenates were performed to assess the intrinsic expression of DBP and VDR.

2. Materials and methods

2.1. Tissue preparation

Adult Wistar rats (male n=4, females n=4) were killed by prolonged ether anesthesia followed by cardiac perfusion with 4% formaldehyde in PBS (0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.2, containing 0.9% NaCl). Tissue samples containing the VNO were rapidly dissected and postfixed in the same fixative. Samples were dehydrated through ascending ethanol series and embedded in EPON 812 (Sigma-Aldrich, München, Germany). Serial semithin sections (1 µm) were cut on a Reichert Ultracut microtome, mounted onto APES-coated glass slides (Thermo Scientific, Braunschweig, Germany) and air dried.

2.2. Electron microscopy

EPON embedded tissue block containing the VNO were brought to size (approximately 1 × 1 mm) and cut with low angle diamond knives (DIATOME, Biel, Switzerland) into serial ultrathin sections (70 nm, Reichert Ultracut). Sections were collected onto Formvar coated nickel grids (H9 SPEC, Science Services, Munich, Germany) and contrasted with 1% uranyl acetate in H₂O (10 min at RT) followed by freshly prepared 2% aqueous lead citrate solution. Sections were examined in an EM 902 (ZEISS, Oberkochen, Germany) at 80 kV.

2.3. Immunohistochemistry

Epoxy resin was removed by incubation in 10% sodium methoxide, methanol/benzene 1:1 and two times in acetone for two minutes each and afterwards rinsed in Tris buffered saline (TBS). The sections were preincubated in 2% normal donkey serum in TBS at room temperature (RT) for 30 min to block non-specific reactions. Concentrated bovine serum albumin BSA-cTM 10% (Aurion, Wageningen, Netherlands) was diluted to 0.1% and added to all antibodies to block further non-specific reactions. After rinsing in TBS sections were incubated for a specific double immunostaining with goat anti-VDR (Chemicon Temecula, USA) diluted 1:500 in TBS and rabbit anti-DBP (Atlas Antibodies, Stockholm, Sweden) diluted 1:200 in TBS in a humid chamber at 4 °C overnight. After washing in TBS sections were incubated in the dark with donkey Alexa Fluor 568 labelled anti-goat IgG (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) diluted 1:200 in TBS and Alexa Fluor 488 labelled anti-rabbit IgG (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) at RT for 60 min. Sections were mounted with Mowiol containing 2% DAPI (AppliChem, Darmstadt, Germany) and examined with an Olympus BX 50 microscope equipped with epifluorescence illumination (filter combinations WU and WIBA). An Olympus DP10 camera was used for microphotography. Immunohistochemical negative controls were performed with normal goat or normal rabbit serum instead of the specific primary antibodies. All controls were unstained. Positive controls for DBP were exemplarily performed with rat liver sections to verify specific staining (results not shown). For a specific double staining with rabbit anti-DBP diluted 1:200 in PBS and goat anti-OMP (Wako

chemicals, USA) diluted 1:500 in PBS the sections were incubated in a humid chamber at 4 °C overnight. After rinsing in PBS sections were incubated in the dark with Fab Cy3 labelled anti-goat IgG (Molecular Probes, Eugene, USA) and Alexa Fluor 488 labelled anti-rabbit IgG diluted 1:200 in PBS at RT for 60 min. Controls were performed with the respective normal serum instead of the specific antibody and with nuclear stain (Hoechst) diluted 1:1000 in PBS at RT for 15 min.

2.4. In situ hybridization

A synthetic 25 mer oligonucleotide probe complementary to DBP encoding mRNA was designed as previously described (Jirikowski et al., 2009) (Bioscientia, Jena). The probe was labelled by 3' tailing with 5'bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) (Sigma) with terminal transferase (TTT Kit, Boehringer Mannheim). For details of this method see (Jirikowski et al., 1989). Epoxy resin was removed from semithin sections as described above prior to hybridization with the BrdU labelled probe (10pM in hybridization buffer, Omnibuff, Wack Chemie) 1 h at 37 °C in a humid chamber. For details on the sequence of the DBP probe and the hybridization procedure see reference (Jirikowski et al., 2009). The respective sense probe was used for control purposes. After hybridization sections were washed in PBS and incubated with a mouse monoclonal antibody to BrdU, diluted 1:200 in PBS (Progen, Heidelberg, Germany) over night at 4 °C. After washing in PBS, sections were incubated with a goat anti-mouse IgG, labelled with Alexa Fluor 488 (Molecular Probes), diluted in PBS 1:200. After another washing step, sections were subjected to fluorescence microscopy as described above.

2.5. Reverse transcriptase PCR

Rats were killed by prolonged ether anesthesia and decapitation. VNOs were rapidly dissected. Total RNA was isolated by TRIzol[®] extraction. Samples were collected in reaction tubes with 1 ml TRIzol[®] and homogenized mechanically (Ultraturrax T3) followed by sonication. Homogenized samples were incubated for 5 min at RT. 0.2 ml chloroform was added and the tubes were shaken by hand for 15 s. After an incubation for 3 min at RT samples were centrifuged at 12000 xg for 15 min at 4 °C. The aqueous phase, containing the isolated RNA, was placed into a new tube. For RNA precipitation samples were mixed with 0.5 ml of 100% isopropanol, incubated for 10 min at RT and then again centrifuged at 12000 xg for 10 min at 4 °C. Supernatant was removed from the tube. The pellet was resuspended by briefly vortexing in 1 ml 75% ethanol. After centrifugation (7500 xg, 5 min, 4 °C) the supernatant was discarded. The air-dried pellet was resuspended in 50 µl of RNase-free water and incubated in a heat block at 55 °C for 15 min.

Reverse transcription and PCR were conducted with QIAGEN OneStep RT-PCR Kit. The used primer sets for VDR, DBP as well as β-actin, are available from Biomol GmbH, Germany. The following primer sequences for VDR (rat) were used: forward primer: 5'- TGA AGG CTG CAA AGG TTT CT-3' and reverse primer: 5'-TAG CTT GGG CCT CAG ACT GT-3' with a product size of 250 bp. For DBP (rat) we used the following primers: forward primer: 5'-TAC TTC ATG CCA ACT GCT GA-3' and reverse primer: 5'-AGG GTT TTC AGG GTC GTA TC-3' with a product size of 179 bp. The primers for the housekeeping gene β-actin (rat) were: forward primer: 5'- CAC ACT GTG CCC ATC TAT GA-3' and reverse primer: 5'- CCG ATA GTG ATG ACC TGA CC-3' with a product size of 272 bp.

The cycling conditions (Biometra T3 Thermocycler) included 50 °C for 30 min for the reverse transcription and 95 °C for 15 min

as the initial PCR activation step, followed by 35 cycles of a 3-step cycling of 94 °C for 30 s, 53 °C for 45 s and 72 °C for 1 min, and a final extension step of 72 °C for 10 min. The final PCR product was separated in an agarose-gel (1.2%). The amplification product was visualized with ethidium bromide under ultraviolet light. Standard DNA size marker was used to estimate the size of the PCR product (Low range DNA ladder, Jena Bioscience, Germany).

3. Results

3.1. Immunohistochemistry

A portion of sensory neurons in the SE of the rat VNO showed specific immunofluorescence for VDR in the perinuclear cytoplasm and in some nuclei (Fig. 1A+, *). VDR positive dendrites were in part

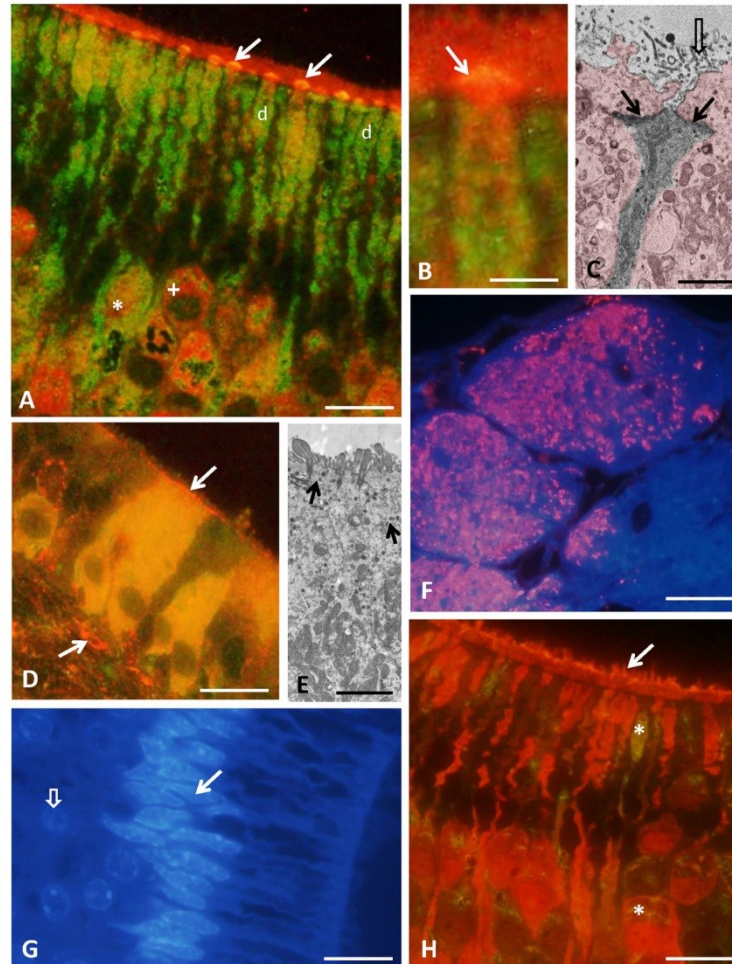


Fig. 1. (A) Double immunostaining for VDR (red) and DBP (green) in the SE. Perikarya of sensory neurons show either cytoplasmic VDR immunofluorescence (+), nuclear staining (*) or both. Immunofluorescence for DBP occurs in cytoplasm and in apical dendrites (d), in part colocalized with VDR. Double staining appears also in knoblike dendritic endings (arrows). Scalebar = 5 μ m. (B) Detail magnification of (A) Colocalization of VDR and DBP in the apical portion of a dendrite (arrows). Scalebar = 1 μ m. (C) Electron micrograph of a sensory dendrite similar to the one shown in B: Microvilli of sensory dendrite extend towards the VND (open arrow). Dendrites are encased by supporting cells (pink stained). Contact Zones between apical dendrites and supporting cells appear to be enlarged tight junctions (arrows) which may resemble the DBP and VDR double stained structures in B. Scalebar = 0.5 μ m. (D) A fraction of the ciliated cells in the NSE shows yellow cytoplasmic double staining for DBP and VDR coexistence. Non-sensory cilia and sub mucosal nerve fibers (arrows) are VDR positive but DBP negative. Scalebar = 5 μ m. (E) Electron micrograph of the apical portion of a ciliated cell in the NSE. These cells extend short, rodlike kinocilia and small microvilli. They contain numerous dense cored secretory vesicles (arrows). Scalebar = 0.5 μ m. (F) A portion of the secretory cells within the vomeronasal glands show granular cytoplasmic immunofluorescence for DBP. Scalebar = 5 μ m. (G) Control with nuclear stain (Hoechst). Cell nuclei of the supporting cells (arrow) and the sensory neurons (open arrow). Scalebar = 5 μ m. (H) Double staining of OMP (red) and DBP (green) of the SE. Colocalization (*) was seen in some dendrites and perinuclear cytoplasm. Scalebar = 5 μ m.

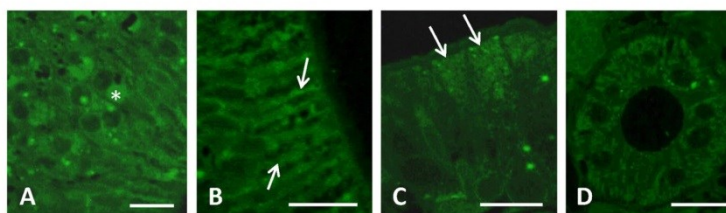


Fig. 2. Immunofluorescence for BrdU indicating hybridization product of DBP encoding transcripts: (A) Numerous perikarya of sensory cells within the SE show cytoplasmic hybridization product (*). (B) Hybridization signal is also visible in sensory dendrites (arrows). (C) Some of the ciliated cells in the NSE show DBP specific hybridization product (arrows). (D) A fraction of exocrine cells in the vomeronasal glands contains BrdU immunofluorescence after hybridization with the DBP antisense probe. Scalebars = 10 μ m.

associated with intraepithelial capillaries. Dendrites extended towards the VND and formed knoblike protrusions, which showed VDR immunostaining. Microvilli were VDR positive (Fig. 1A and B). DBP immunoreactivity was observed in cytoplasm of sensory neurons in part colocalized with VDR (Fig. 1A and B). Colocalization of VDR and DBP was most abundant in sensory dendrites and in dendritic protrusions while microvilli were DBP negative. Electron microscopy indicated that apical dendrites of sensory cells were engulfed by supporting cells with electron dense membrane thickenings which appear to be enlarged tight junctions (Fig. 1C). They may resemble the DBP and VDR double stained structures in Fig. 1B (arrows).

Single ciliated cells within the NSE showed intense cytoplasmic VDR immunofluorescence while the majority of these cells remained unstained. Almost all of the VDR positive cells exhibited also DBP immunofluorescence. VDR and DBP immunostaining appeared as granular cytoplasmic reaction product while nuclei remained unstained in most cases. Some of the subepithelial nerve fibers were VDR stained (Fig. 1D). Electron microscopy of the NSE revealed that ciliated cells had short rod like kinocilia and short microvilli. Numerous dense cored vesicles of about 100 nm diameter were observed in the apical portions of these cells (Fig. 1E). These cilia and microvilli of VDR and DBP positive epithelial cells showed intense VDR immunofluorescence, but no staining for DBP (Fig. 1D).

DBP immunostaining but not VDR was observed in a portion of the secretory cells in the vomeronasal glands (VNG). This immunoreactivity appeared to be confined to secretory granules (Fig. 1F).

There were no obvious differences between male and female rats regarding the distribution of both VDR and DBP throughout the VNO. All negative control incubations remained without specific staining. Some control tissues were stained with Hoechst nuclear stain (Fig. 1G).

Colocalization of DBP and OMP was observed in a portion of cells in the SE. Some of the OMP positive dendrites and perinuclear cytoplasm were also DBP positive (Fig. 1H*). OMP positive microvilli did not show DBP staining (Fig. 1H, arrow).

3.2. In situ hybridization for DBP

Immunofluorescence for BrdU indicating hybridization product of DBP encoding transcripts with the BrdU labelled probe was observed in a fraction of the sensory neurons within the SE (Fig. 2A). BrdU immunofluorescence was confined to the perinuclear cytoplasm but occurred also in some of the sensory dendrites (Fig. 2B). Some of the ciliated cells in the NSE showed DBP specific hybridization product in the apical portion of cytoplasm (Fig. 2C). A fraction of exocrine cells in the vomeronasal glands contained BrdU immunofluorescence after hybridization with the DBP

antisense probe (Fig. 2D). Control hybridizations with the sense probe were devoid of BrdU immunofluorescence.

3.3. Reverse transcriptase PCR (RT–PCR)

Ethidium bromide staining of agarose gels demonstrated specific amplification products of VDR (Fig. 3A) and of DBP (Fig. 3B) encoding transcripts after RT-PCR. RNA extracts from liver and from olfactory epithelium were used as positive controls for both VDR and DBP. Clear bands for VDR at the expected size of approximately 250 bp were seen in RNA extracts from liver, olfactory mucosa and VNO. Bands from liver-extracts were strongest stained (Fig. 3A). Bands for DBP were also seen in liver, olfactory mucosa and VNO at the expected size of 180 bp (Fig. 3B). Internal controls with RT-PCR for β -actin showed specific amplification product at 280 bp in all samples.

4. Discussion

The vomeronasal organ is known to be the primary target of steroidal pheromones. Volatile and non-volatile metabolites of androgens and of estrogens enter the vomeronasal duct and stimulate sensory neurons which in rodents project to the accessory olfactory bulbs. Although the cellular and molecular mechanisms of steroid actions in the VNO are still a matter of controversy, it is clear that behavioral changes including arousal and sexual receptivity are mediated through gonadal steroids recognized within the VNO. Our observations indicate that also VD3 and its derivatives are among the olfactory steroids in rat. In reptiles it has been shown that VD3 analogues act as pheromones: If VD3 is applied in sufficient quantities male rock lizards produce provitamin D in femoral gland secretions important for scent marking, which attracts females (Martin and Lopez, 2006). In most mammalian species including humans VD3 is an important neurosteroid (Kalueff and Tuohimaa, 2007). Expression and localization of both VDR and DBP have been shown to occur in various brain regions (Prufer et al., 1999; Jirikowski et al., 2009). VDR was found among others in the olfactory sensory systems and in male rat hypothalamus (Prufer and Jirikowski, 1997; Prufer et al., 1999). VDR was partly colocalized with oxytocin, especially in the neurons of the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus. The distribution of VDR in sensory and limbic brain systems suggests various functions of VD3 in mammals, including known behavioral changes. Vitamin D has also important neuroprotective functions and is involved in brain development and nerve growth (Harms et al., 2011; Soni et al., 2012). The widespread distribution of vitamin D binding proteins in the brain can be explained in part by that fact.

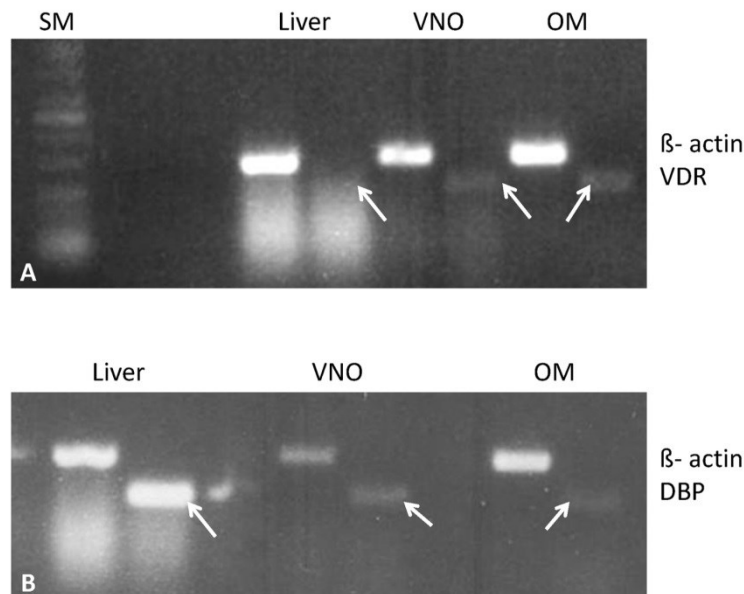


Fig. 3. (A) Ethidium bromide gel of RT-PCR product after amplification of VDR encoding transcripts in the liver, the VNO and the olfactory mucosa (OM). Arrows indicate bands of approximately 250 bp. RNA extracts from liver were used as controls, amplification of β -actin was used as internal control of the PCR. SM = molecular size marker. (B) Ethidium bromide gel of RT-PCR product after amplification of DBP encoding transcripts in the liver, the VNO and the OM. Arrows indicate bands of approximately 180 bp. RNA extracts from liver were used as controls, amplification of β -actin was used as internal control of the PCR.

In this work we found morphological evidence for the occurrence of DBP and VDR in the rat VNO. We showed that DBP and VDR are in part colocalized in sensory neurons and in a portion of the non-sensory cells in the rat VNO. The intracellular distribution of the two immunoreactive proteins is quite different in the SE: While VDR occurs in the perinuclear cytoplasm and/or in nuclei, DBP immunofluorescence is predominantly cytoplasmic and mostly confined to axons and to apical dendrites. Nuclear VDR immunofluorescence may indicate receptors translocated into the nucleus whereas cytoplasmic VDR staining may indicate biosynthesis of the protein, which is also supported by our RT-PCR data. VDR immunofluorescence occurred also in the knoblike dendritic endings, colocalized with DBP but microvilli showed VDR staining only. Membrane receptors for gonadal steroid hormones have been shown to occur in various cell types (Schumacher, 1990). So far there is no evidence for the existence of membrane receptors for vitamin D. Our observation of VDR immunofluorescence in microvilli of sensory neurons may indicate presence of such receptors.

Electron microscopy of the SE showed apical dendrites of sensory neurons with long microvilli, engulfed by supporting cells. Tight junctions connecting apical dendritic protrusions with supporting cells appeared to be thickened. Similar observations had been made before (Hofer et al., 2000). Judging from the detail magnification of our immunofluorescent images we conclude that structures within the knoblike dendritic endings that showed VDR and DBP double staining are associated with these tight junctions. The functional importance of both vitamin D binding proteins in this membrane compartment has yet to be studied. With light microscopical immunocytochemistry it is not possible to determine in which way VDR is associated with the cell membrane. Clearly VDR does not have the molecular characteristics of a

membrane receptor and neither does DBP. Known rapid effects of steroid hormones and subsequent non-genomic actions probably involve membrane receptors (Schumacher, 1990; Thomas, 2012). It is conceivable that the interaction of classic steroid receptor proteins with steroid binding globulins is important for olfactory steroid signaling. DBP expressed within sensory neurons may be involved in accumulation and transport of VD3 within the neuron's cytoplasm.

A distinct population of non-sensory ciliated cells shows colocalization of both DBP and VDR. The functional significance of these cells is not clear to date. In a recent study we found the expression of OMP in a portion of ciliated non-sensory VNO cells in rat (Rodewald et al., 2016). These cells had the ultrastructural features of gustatory cells since they had short cilia and received innervations. Here we found that some of the ciliated cells were VDR-positive. Further experiments with double staining for both DBP and OMP showed a partly colocalization of both proteins in the SE of the rat VNO. Whether the non-sensory VD3 targets overlap with the ciliated cells in the NSE is the topic of ongoing immunoelectron microscopical studies. Previous ultrastructural investigations suggested that ciliated cells in the NSE have secretory properties (Hofer et al., 2000; Elgayar et al., 2014; Adams and Wiekamp, 1984). Our immunohistochemical and our electron microscopical observations suggest that DBP is among the substances liberated by ciliated cells.

DBP but not VDR occurred in some of the exocrine cells within the vomeronasal glands. DBP immunofluorescence appeared in these cells as granulated reaction product likely representing large secretory vesicles. Although DBP immunoassays of vomeronasal secretions have not been performed yet it seems safe to conclude that DBP is liberated from vomeronasal glands to bind and stabilize volatile and non-

volatile VD3 derivatives that had been accumulated in the vomeronasal duct.

In this study we investigated both intact male and untreated cycling female rats. Obvious sex differences in the distribution of VDR and DBP were not detected. More studies are necessary to determine whether more subtle differences occur perhaps associated with functional status including pregnancy, sexual arousal, castration etc. The importance of olfactory VD3 for mammalian behavior similar to recently described observations in reptiles (Martin and Lopez, 2006) is the topic of further studies.

Ethical statement

Animal experiments were approved by Thuringian state government (protocol # 02-040/10).

Acknowledgement

V.M.G. is a recipient of an EMBO fellowship.

References

- Adams, D.R., Wiekamp, M.D., 1984. The canine vomeronasal organ. *J. Anat.* 138 (Pt 4), 771–787.
- Armstrong, D.J., Meenagh, G.K., Bickle, I., Lee, A.S., Finch, M.M., 2006. Relationship between vitamin D levels and depression score in fibromyalgia. *Rheumatology* 45 184–184.
- Barrios, A.W., Sanchez-Quintero, P., Salazar, I., 2014. Dog and mouse: toward a balanced view of the mammalian olfactory system. *Front. Neuroanat.* 8, 106.
- Berghard, A., Buck, L.B., Liman, E.R., 1996. Evidence for distinct signaling mechanisms in two mammalian olfactory sense organs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 2365–2369.
- Bikle, D.D., et al., 1986. Assessment of the free fraction of 25-Hydroxyvitamin-D in serum and its regulation by albumin and the vitamin-D-Binding protein. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 63, 954–959.
- Bock, P., Rohn, K., Beineke, A., Baumgartner, W., Wewetzer, K., 2009. Site-specific population dynamics and variable olfactory marker protein expression in the postnatal canine olfactory epithelium. *J. Anat.* 215, 522–535.
- Breipohl, W., Bhatnagar, K.P., Mendoza, A., 1979. Fine structure of the receptor-free epithelium in the vomeronasal organ of the rat. *Cell Tissue Res.* 200, 383–395.
- Clancy, A.N., Coquelin, A., Macrides, F., Gorski, R.A., Noble, E.P., 1984. Sexual behavior and aggression in male mice: involvement of the vomeronasal system. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 4, 2222–2229.
- Cooke, N.E., David, E.V., 1985. Serum vitamin-D-binding protein is a 3rd member of the albumin and alpha-Fetoprotein gene family. *J. Clin. Invest.* 76, 2420–2424.
- Dennis, J.C., Allgier, J.G., Desouza, L.S., Eward, W.C., Morrison, E.E., 2003. Immunohistochemistry of the canine vomeronasal organ. *J. Anat.* 202, 515–524.
- Dolz, W., Eitner, A., Caldwell, J.D., Jirikowski, G.F., 2013. Expression of corticosteroid binding globulin in the rat olfactory system. *Acta Histochem.* 115, 376–381.
- Doving, K.B., Trotter, D., 1998. Structure and function of the vomeronasal organ. *J. Exp. Biol.* 201, 2913–2925.
- Elgayar, S.A., Eltony, S.A., Othman, M.A., 2014. Morphology of non-sensory epithelium during post-natal development of the rabbit vomeronasal organ. *Anat. Histol. Embryol.* 43, 282–293.
- Farbman, A.I., Margolis, F.L., 1980. Olfactory marker protein during ontogeny: immunohistochemical localization. *Dev. Biol.* 74, 205–215.
- Fleischer, J., Hass, N., Schwarzenbacher, K., Besser, S., Breer, H., 2006. A novel population of neuronal cells expressing the olfactory marker protein (OMP) in the anterior/dorsal region of the nasal cavity. *Histochem. Cell Biol.* 125, 337–349.
- Ganji, V., Milone, C., Cody, M.M., McCarty, F., Wang, Y.T., 2010. Serum vitamin D concentrations are related to depression in young adult US population: the third national health and nutrition examination survey. *Int. Arch. Med.* 3, 29.
- Glaser, S.D., Veenstra, T.D., Jirikowski, G.F., Prufert, K., 1999. Distribution of 1,25-dihydroxyvitamin D-3 receptor immunoreactivity in the rat olfactory system. *Cell. Mol. Neurobiol.* 19, 613–624.
- Harms, L.R., Burne, T.H.J., Eyles, D.W., McGrath, J.J., 2011. Vitamin D and the brain. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 25, 657–669.
- Hofer, D., Shin, D.W., Drenckhahn, D., 2000. Identification of cytoskeletal markers for the different microvilli and cell types of the rat vomeronasal sensory epithelium. *J. Neurocytol.* 29, 147–156.
- Holy, T.E., Dulac, C., Meister, M., 2000. Responses of vomeronasal neurons to natural stimuli. *Science* 289, 1569–1572.
- Jirikowski, G.F., Ramalho-Ortigao, J.F., Lindl, T., Seliger, H., 1989. Immunocytochemistry of 5-bromo-2'-deoxyuridine labelled oligonucleotide probes. A novel technique for in situ hybridization. *Histochemistry* 91, 51–53.
- Jirikowski, G., Kauntzer, U., Dief, A., Caldwell, J., 2009. Distribution of vitamin D binding protein expressing neurons in the rat hypothalamus. *Histochem. Cell Biol.* 131, 365–370.
- Jorde, R., Waterloo, K., Saleh, F., Haug, E., Svartberg, J., 2006. Neuropsychological function in relation to serum parathyroid hormone and serum 25-hydroxyvitamin D levels – the tromso study. *J. Neurol.* 253, 464–470.
- Kalueff, A.V., Tuohimaa, P., 2007. Neurosteroid hormone vitamin D and its utility in clinical nutrition. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 10, 12–19.
- Leybold, B.G., et al., 2002. Altered sexual and social behaviors in trp2 mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 6376–6381.
- Luo, M., Katz, L.C., 2004. Encoding pheromonal signals in the mammalian vomeronasal system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14, 428–434.
- Mangelsdorf, D.J., et al., 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835–839.
- Martin, J., Lopez, P., 2006. Vitamin D supplementation increases the attractiveness of males' scent for female Iberian rock lizards. *Proc. Biol. Sci.* 273, 2619–2624.
- McGrath, J.J., Feron, F.P., Burne, T.H.J., Mackay-Sim, A., Eyles, D.W., 2004. Vitamin D-3 – implications for brain development. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 89–90, 557–560.
- Ploss, V., Gebhart, V.M., Dolz, W., Jirikowski, G.F., 2014a. Sex hormone binding globulin in the rat olfactory system. *J. Chem. Neuroanat.* 57–58, 10–14.
- Ploss, V.M., Gebhart, V.M., Gisder, D., Dolz, W., Jirikowski, G.F., 2014b. Localization of sex hormone binding globulin in the rat vomeronasal organ. *J. Chem. Neuroanat.* 61–62, 120–123.
- Prufert, K., Jirikowski, G.F., 1997. 1,25-Dihydroxyvitamin D-3 receptor is partly colocalized with oxytocin immunoreactivity in neurons of the male rat hypothalamus. *Cell. Mol. Biol.* 43, 543–548.
- Prufert, K., Veenstra, T.D., Jirikowski, G.F., Kumar, R., 1999. Distribution of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor immunoreactivity in the rat brain and spinal cord. *J. Chem. Neuroanat.* 16, 135–145.
- Rodewald, A., Gisder, D., Gebhart, V.M., Oehring, H., Jirikowski, G.F., 2016. Distribution of olfactory marker protein in the rat vomeronasal organ. *J. Chem. Neuroanat.* 77, 19–23.
- Schumacher, M., 1990. Rapid membrane effects of steroid hormones: an emerging concept in neuroendocrinology. *Trends Neurosci.* 13, 359–362.
- Smith, T.D., et al., 2011. Olfactory marker protein expression in the vomeronasal neuroepithelium of tamarins (*Saguinus* spp.). *Brain Res.* 1375, 7–18.
- Soni, M., et al., 2012. Vitamin D and cognitive function. *Scand. J. Clin. Lab. Investig. Suppl.* 243, 79–82.
- Speckaert, M., Huang, G.M., Delanghe, J.R., Taes, Y.E.C., 2006. Biological and clinical aspects of the vitamin D binding protein (Gc-globulin) and its polymorphism. *Clin. Chim. Acta* 372, 33–42.
- Thomas, P., 2012. Rapid steroid hormone actions initiated at the cell surface and the receptors that mediate them with an emphasis on recent progress in fish models. *Gen. Comp. Endocrinol.* 175, 367–383.
- Wang, Y.J., Zhu, J.G., DeLuca, H.F., 2012. Where is the vitamin D receptor? *Arch. Biochem. Biophys.* 523, 123–133.
- Yang, L., Ma, J.F., Zhang, X.L., Fan, Y., Wang, L.N., 2012. Protective role of the vitamin D receptor. *Cell. Immunol.* 279, 160–166.

4.3 Publikation III: Steroidal pheromones and their potential target sites in the vomeronasal organ

Rodewald A, Mills D, Gebhart VM, Jirikowski GF. 2017. Steroids (in Druck)

Die hauptsächlich über das VNO aufgenommenen Pheromone sind eine heterogene Gruppe von Molekülen, zu denen auch verschiedene Steroidderivate zählen. Die vorliegende Publikation fasst den aktuellen Kenntnisstand der im VNO relevanten Steroide zusammen und betrachtet speziell die Rolle des Vitamin Ds im VNO. Basierend auf den bisherigen morphologischen Untersuchungen führte ich erste olfaktorische Tests mit Hunden durch. Dabei wurde untersucht, ob Makrosmatiker in der Lage sind, Vitamin D-Derivate olfaktorisch wahrzunehmen. Aufgenommen wurden die Riechzeiten während des direkten Kontaktes zu den Proben und eventuelle Verhaltensänderungen. Vier unterschiedliche Konzentrationen des Vitamin D-Derivats Cholecalciferol wurden in unterschiedlichen Reihenfolgen gepaart mit einer Kontrolle ohne Vitamin D-Derivat den Hunden zur olfaktorischen Wahrnehmung angeboten. Flehmenähnliches Verhalten, eine Reaktion, die meist nach der Pheromondetektion erfolgt, konnte nicht beobachtet werden. Die längste Riechdauer mit dem Median von 1,85s \pm 0,7s konnte an der geringsten Konzentration des Cholecalciferols beobachtet werden. Die Wahrnehmung besonders geringer Konzentrationen von Cholecalciferol ist nicht überraschend. Hunde leben als Makrosmatiker in einer olfaktorisch geprägten Welt und nehmen damit geringste Konzentrationen von Molekülen, die beispielsweise zur Kommunikation eingesetzt werden, wahr. Um die genauen Mechanismen der Steroidwirkung zu verstehen, wird unter Berücksichtigung unserer bisherigen Ergebnisse und dem aktuellen Forschungsstand ein Schema speziell für Vitamin D vorgeschlagen, welches insbesondere die verschiedenen Möglichkeiten der schnellen und nicht-genomischen Antwort betrachtet.

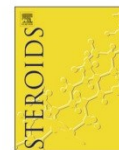
Eigenanteil:

- Mitwirkung an der Planung der verhaltensbiologischen Versuche
- Durchführung der olfaktorischen Tests mit Hunden
- Schemaerstellung zur Membranwirkung von Vitamin D
- Literaturrecherche
- Verfassung des Manuskripts



Contents lists available at ScienceDirect

Steroids

journal homepage: www.elsevier.com/locate/steroids

Steroidal pheromones and their potential target sites in the vomeronasal organ

Andrea Rodewald^{a,*}, Daniel Mills^b, Veronika M. Gebhart^a, Gustav F. Jirikowski^a

^a Institute of Anatomy II, University Hospital, Jena, Germany

^b School of Life Science, University of Lincoln, UK

ARTICLE INFO

Keywords:

Pheromones
Nuclear steroid receptors
Steroid binding globulins
Vitamin D
Vomeronasal organ

ABSTRACT

Steroids are important olfactory signals in most mammalian species. The vomeronasal organ has been suspected to be the primary target of pheromones. In rat vomeronasal sensory neurons express steroid binding proteins and nuclear receptors. Some binding globulins were found also in single ciliated cells of the non-sensory vomeronasal epithelium. Immunoelectron microscopy revealed VDR in olfactory microvilli and DPB in apical membrane protrusions of supporting cells within the sensory epithelium. Pilot behavioral studies with dogs showed increased sniffing duration upon exposure to low concentrations of vitamin D while higher concentrations were less effective. It has been shown that vitamin D has pheromone-like properties in lizards. Our histochemical and behavioral observations indicate that the mammalian vomeronasal organ may be a vitamin D target. Olfactory functions of vitamin D involve most likely rapid membrane mediated effects rather than actions through nuclear receptors.

1. Introduction

Pheromones are chemical signals that excite rapid behavioral changes in numerous mammalian and non-mammalian species. The first pheromones were referred to as 'ectohormones' and were used by insects in intraspecific sexual communication [1,2] and were found to be alcohols. Today they are known to consist of a heterogeneous group of olfactory ligands, which includes peptides, amines and steroids. Their function extends sexual communication – they can also act as alarm signals to reduce the danger from predators [3], chemical territorial signatures [4] that reduce the risk of conflict or alter aggressive tendencies in other context [5]. In this review the term pheromone is used for substances that may have mainly other functions but could also have pheromone-like properties.

While classical neurotransmitters act through well-known receptor systems, the functional properties of steroid hormones are less clear in this context. Steroid effects are known to be mediated through nuclear receptors and direct genomic actions, which seem too slow for rapid behavioral changes [6,7]. Rapid responses to steroids may involve membrane effects [8–10]. The underlying mechanisms are not clear to date.

Most species with a well-developed olfactory system, referred to as "macrosmatics" possess a highly sophisticated receptor organ for pheromones, the vomeronasal organ (VNO), which has been suspected

to be the primary target of olfactory steroids. Other portions of the olfactory system are likely to recognize pheromones too, e.g. alarm pheromones, which are detected via the Gruenberg ganglion [11]. The VNO is specialized for gender-specific recognition of pheromones [12]. The main olfactory epithelium (MOE) can also be involved in mediation of some responses to pheromones [13,14]. Newborn rabbits show impaired nipple search behavior after VNO lesions [15] and adult female pigs with blocked VNOs do not show behavioral changes after exposure to androstene [16]. The MOE seems to be important for these functions. In addition, *cnga2* mutant mice (cyclic nucleotide-gated channel α 2, which occurs in the MOE but not in the VNO) show impaired mating and fighting behavior [17]. Type 3 adenylyl cyclase (an enzyme that occurs in the MOE and not in the VNO) deficient male mice neither show normal sexual behavior nor male to male aggressiveness. Such animals are incapable of detecting other pheromones [18]. Destruction of the VNO in male hamsters prior to initial mating results in a complete loss of sexual behavior, whereas VNO lesioning after mating experience does not show this effect [19]. This indicates a critical role of pheromones in the initial guidance of behavioral responses that are later reinforced by experience. Combined lesions of the MOE and the VNO results in absence of mating behavior of all studied male hamsters (without mating experience), whereas the lesion of VNO with an intact MOE abolishes sexual behavior only in some individuals [20]. Probably the combination of both the MOE and the VNO is necessary for the

* Corresponding author at: Institut für Anatomie II, Universitätsklinikum Jena, Teichgraben 7, 07743 Jena, Germany.

E-mail address: Andrea.Rodewald@med.uni-jena.de (A. Rodewald).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2017.09.010>

Received 5 May 2017; Received in revised form 12 September 2017; Accepted 22 September 2017
0039-128X/ © 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

Please cite this article as: Rodewald, A., Steroids (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2017.09.010>

behavioral effects of pheromones. So, olfaction is also experience-based and memory is clearly important in the detection of odors [21]. Although the recognition of pheromones is not confined to the VNO, it still plays a vitally important role, especially in social communication [22–25].

Several steroidal pheromones are known, most of them derivatives of estrogens or androgens, e.g. androstenol, androstadienone, androstene and estratetraenol. Little is known so far about glucocorticoids or vitamin D derivatives in this regard. The vitamin D derivative calcitriol has well known functions in calcium metabolism. Furthermore vitamin D derivatives are important neurosteroids in brain development [26–28]. Expression of vitamin D receptor has been found in rat olfactory mucosa, the olfactory bulb, the hypothalamus and the limbic system. Therefore it seems likely that vitamin D is involved in limbic functions. Here we emphasize the idea that vitamin D analogues can be pheromones based on morphological findings in the olfactory system and the brain.

2. The vomeronasal organ

In mammals the vomeronasal organ (VNO) has been suspected to be the main target of steroid pheromones, which trigger social behaviors via the limbic system. The VNO (Fig. 1A) is an epithelial duct in the floor of the nasal cavity, which is largely independent from the olfactory mucosa [29]. The medial portion of the vomeronasal duct (VND) is lined with sensory epithelium (SE), which consists of sensory neurons, supporting (sustentacular) cells and basal cells [30–33]. Axons of sensory neurons project to the limbic system via the accessory olfactory bulb [34]. Apical dendrites terminate in knoblike protrusions [35]. They extend microvilli, which presumably carry receptors that recognize pheromone molecules within the VND. Supporting cells connect with sensory dendrites via tight junctions. The SE contains numerous capillaries, where hormones could reach the VNO or absorbed molecules may be carried away from the VNO via the blood system. The portion of the VND, opposite to the SE is coated with a heterogeneous group of cells (Fig. 1B), the non-sensory epithelium (NSE) [36,37]. NSE cells have short, rod like kinocilia and microvilli. Some of these cells receive axonal terminals, which has led to the assumption that ciliated

cells are chemosensory [38]. Localization of α -gustducin, a marker of gustatory cells could not be shown in rat VNO [35], but was seen in mouse VNO in the transitional epithelium between NSE and SE [39]. Vomeronasal glands (VNG) release their secretions into the VND [40]. The NSE is bedded on one or two large muscular veins. They are thought to expand or contract thus providing a pumping mechanism for secretions within the VND, which terminates on top of the incisive foramen. In most macrosmatics this foramen opens into the oral cavity [30,41]. Many species (including horses, goats and cats [42–44]) raise their upper lip (flehmen) as part of the process to guide inhaled air through the foramen to the opening of the VND so that pheromones can get in contact with secretions coming out and then going back into the VND [45,46].

Only a few of the steroidal pheromones are volatile, e.g. androstadienone or androstene [47,48] and many of them are considered non-volatile including estradiol or progesterone. Aerosols of these hormones are taken up by direct contact during close up sniffing of external steroid deposits such as urine markings, feces, sweat or anal gland secretions [49,50]. Although there is evidence for a VNO-like structure in all mammals, the debate as to whether some primates (including humans) possess a functionally relevant VNO is not yet resolved. The incisive foramen is obliterated in humans and the VND is preserved in only a few individuals and there is no evidence of flehmen behavior normally occurring. However, as discussed below, humans are sensitive to some pheromonal signals [51] and have been shown to respond to olfactory steroids with relevant increased brain activity [48]. However conscious perception of aerosolic steroids [52] does not seem to occur in Primates.

3. Steroids in the VNO and in the brain

Previous studies have documented that the VNO is a target for gonadal steroids. We recently observed the expression of sex hormone binding globulin (SHBG), a transport protein for estradiol and testosterone, in the rat VNO [53,54]. Immunohistochemical staining indicated single SHBG positive cells across the olfactory epithelium, which were colocalized with olfactory marker protein (OMP) [53]. Most of the SHBG positive cells appeared in the SE of the VNO with

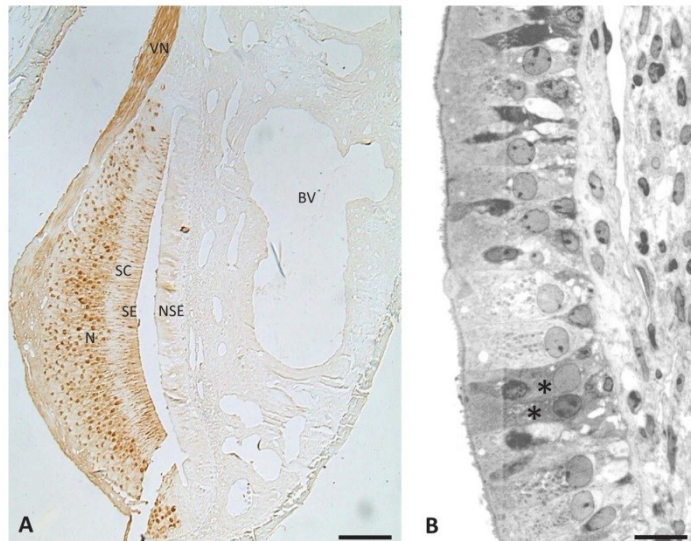


Fig. 1. A: Overview of the rat VNO immunostained for OMP. SE = sensory epithelium, NSE = non sensory epithelium, N = Sensory neurons, SC = supporting (sustentacular) cells, VN = vomeronasal nerve, BV = Blood vessel. Scale bar = 50 µm. B: Detail of the NSE, semithin section, stained with methylene blue. A portion of the NSE cells exhibits dark cytoplasm and short kinocilia (*). Scale bar = 5 µm.

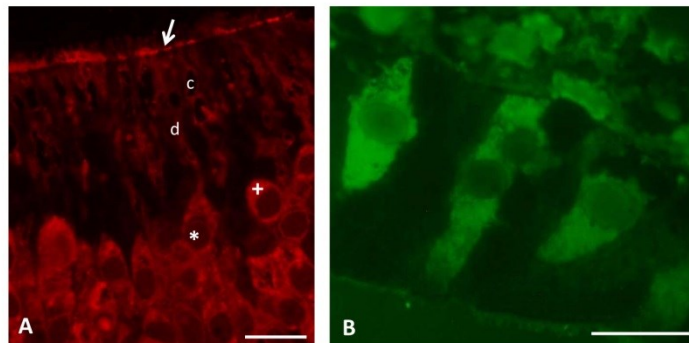


Fig. 2. A: SE immunostained for VDR. A portion of the sensory neurons shows cytoplasmic immunofluorescence (+) while nuclei are mostly unstained (*). Sensory dendrites (d) and sensory cilia (arrow) are VDR positive. Dendrites are interspersed by capillaries (c). Scale bar = 7 μ m. B: OMP immunofluorescence in single ciliated cells of the NSE. Scale bar = 7 μ m.

projections to the accessory olfactory bulb [54]. Single cells in the NSE showed also SHBG specific staining. Reverse transcriptase PCR (RT-PCR) results confirmed an intrinsic SHBG expression in the VNO [53]. Expression of the putative membrane receptor for estrogens G-protein-coupled receptor 30 (GPR30) and of estrogen receptor α (ER α) was also seen in the SE of the mouse VNO [55]. Both androgen and estrogen receptors are found throughout the rat brain, e.g. the hypothalamus and the accessory olfactory bulb [56].

It is likely that biosynthesis and metabolism of neuroactive steroids occurs also within the brain [57,58]. Furthermore their known pheromonal properties are mediated through the VNO and its projections to the limbic system. Bruce and coworkers described 1960 the failure of pregnancy in early pregnant mice after exposure to the odor of foreign fertile males urine (Bruce effect) [59,60]. Implantation of the blastocyst in the endometrium did not take place in these cases. Although it had been suggested that the Bruce effect might have been an artifact due to laboratory conditions, similar observations were made in wild geladas in Ethiopia [61], indicating a wider biological and evolutionary significance. Lesioning the VNO of female mice reduces the Bruce effect [62,63]. Castrated male mice with insufficient testosterone in their urine fail to induce the Bruce effect [64]. Injections with testosterone restore excretion pregnancy-blocking pheromones [65] in these animals.

Testosterone dependent compounds with pheromonal activity are known to bind to the vomeronasal receptor class V1R [25], but it is not clear whether testosterone is involved directly in pheromone-dependent behavioral changes. Studies with functional magnetic resonance imaging (fMRI) demonstrated a brain response (especially in the hypothalamus, which is involved in mating and sexual behavior) in heterosexual women and in homosexual men after exposure to the testosterone derivative 4,16-androstadien-3-one [66]. The estrogen analog estratetraenol had similar effects in heterosexual men and in homosexual women [67]. SHBG and androgen receptors in the VNO probably have important functions for social or sexual behavior in many mammalian species, but testosterone or estradiol alone have no strong effects. It is likely therefore that a combination with other compounds is responsible for effective pheromonal actions.

We described the expression of corticosteroid-binding globulin (CBG) in rat VNO and in the olfactory mucosa partly colocalized with OMP [68]. CBG was also found in human hypothalamic neurons and their neurohypophyseal projections partly colocalized with oxytocin and vasopressin [69]. It is likely that the expression of steroid binding globulins in the limbic system and in VNO is a widespread phenomenon for the most vertebrates, including humans. It may have important functions in social, sexual and stress-related behaviors, since CBG is able to influence the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. Intranasal administration of oxytocin can reduce the stress response in humans (Trier social stress test) [70]. In the rat, CBG in the sensory cells

of the VNO probably influences the limbic system. It may have further functions in social and sexual behavior similar to other steroids. Intranasal application of neuropeptides is the only way to rapidly reach the brain. Unlike steroid hormones most peptides are unlikely to cross the blood-brain-barrier. Therefore it is not surprising to find peptide receptors, steroid receptors and binding proteins in the olfactory mucosa and in the VNO.

Vitamin D binding protein (DBP) is a further important steroid binding globulin, which binds more than 90 % of serum vitamin D derivatives. DBP is synthesized and liberated mainly in liver [71,72]. In recent studies the expression of DBP was observed in both rat hypothalamus [73] and rat VNO [74]. *In situ* hybridization and RT-PCR indicated an intrinsic expression of both VDR and DBP encoding transcripts in the VNO. Both the SE and NSE showed specific immunostaining for DBP, being most abundant in dendrites of the SE neurons and in the perinuclear cytoplasm of the cells in the NSE. Colocalization of DBP and OMP was also seen in a portion of cells in the SE. Some cells in the VNG showed specific staining in their secretory granules. The vitamin D (1 α ,25-dihydroxycholecalciferol) receptor (VDR) belongs to the nuclear steroid receptor group and occurs in various tissues [75–77] and binds to different vitamin D derivatives (with the highest affinity to calcitriol). It was also found in sensory dendrites and in apical protrusions of sensory neurons in the SE (Fig. 2A). Colocalization of VDR and DBP with OMP confirmed that indeed sensory neurons were among the Vitamin D targets within the VNO. VDR immunofluorescence was seen in single cells of the NSE colocalized with DBP. We also found OMP positive cells in the NSE (Fig. 2B) – most likely the same cells that had stained with antibodies to VDR and to DBP. Electron microscopy revealed that these cells had the ultrastructural features of gustatory cells. So recognition of steroidal pheromones in the VNO may not be limited to the SE.

VDR is important for genomic and likely also rapid non-genomic effects [8,78,79]. The exact functions of DBP and VDR in the rodent olfactory system and in the limbic system are yet to be determined. It is clear however that DBP is necessary for transport and for stabilization of vitamin D. Further studies have to show whether VDR has membrane receptor properties and whether DBP can excite membrane effects. Our studies suggested a membrane associated VDR (mVDR) in the VNO [74], but there are different possibilities about the exact location of the VDR and the mechanisms behind the rapid actions of vitamin D in the VNO (Fig. 3). Clearly pheromonal actions of steroid hormones must be also rapid. Classic genomic effects may be too slow for fast behavioral changes. Ethological studies with lizards indicate that vitamin D has pheromone-like properties [80].

4. Behavioral responses to olfactory steroids

Two main classes of pheromones have been described – primer

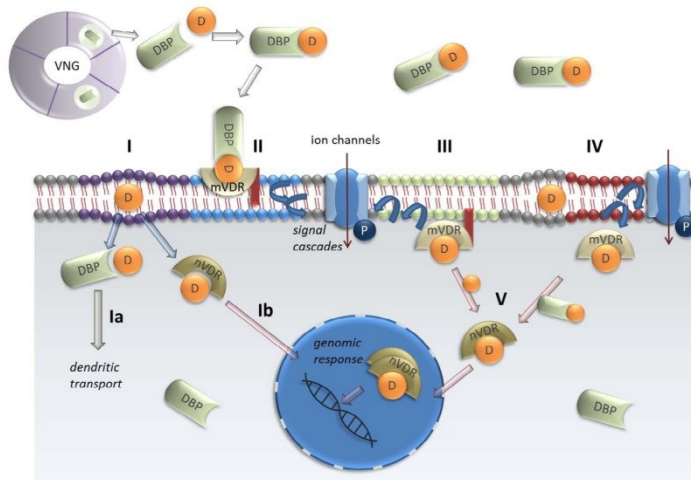


Fig. 3. Possible locations of the VDR and likely mechanisms of VDR and DBP interactions in the SE of the VNO. I: A small portion of the vitamin D derivatives can diffuse through the membrane (purple region of the membrane). It could bind to cytoplasmic DBP, which may be involved in further transport mechanisms in dendrites (Ia) or it could be bound by the nuclear VDR (nVDR), which enters the cell nucleus, dimerised to induce genomic responses (Ib). II: Another possibility is drawn in the blue region: The aerosolic vitamin D derivative in the lumen, bound by DBP from the VNG, could be bound by a membrane associated receptor (mVDR) at the outside of the membrane (likely fixed by an anchor molecule) and induces unknown signal cascades for the rapid responses, mediated e.g. by ion channels. III: The mVDR could be also positioned intracellular, but be also fixed by e.g. an anchor molecule (green region of the membrane). IV: Another way could be the releasing of signal cascades and rapid responses through a free intracellular mVDR, which is located in close proximity of the membrane (red region of the membrane). V: All possibilities of the location of the mVDR required the uptake of the vitamin D derivative into the cell. After mediating rapid responses, vitamin D could be also used for genomic responses via binding to the nVDR after the mVDR 'switched off' and releases vitamin D.

pheromones, causing slow behavioral responses (e.g. the Bruce effect) and releaser pheromones, causing fast behavioral responses like mating or aggressive behavior [81]. Both classes of pheromones need molecular mechanisms to pass through the membrane or to take effect on the membrane. In general, a genomic pathway seems too slow for rapid behavioral changes. However, it has been known for some time that steroid effects can occur within minutes. This includes physiological effects of vitamin D. According to the present concept classic nuclear receptors, which induce the genomic pathways of steroids [82] may not be involved in non-genomic membrane effects which result in rapid responses. Membrane receptors are presumably involved in accumulation of steroid hormones [83–85]. An estrogen receptor α variant associated with the plasma membrane has been postulated [86] and indications of membrane associated classical androgen receptors have also been found [87].

Nemere and coworkers described in the mid-1990s a membrane receptor for calcitriol ($1\alpha,25(\text{OH})_2\text{-Cholecalciferol}$) in the chick intestinal epithelium [88]. The research group led by Tony Norman demonstrated the existence of nuclear VDR in plasma membranes, associated with caveolae [78,89] of different tissues in several species including humans. The colocalization of caveolin-1, the caveola marker protein in the membrane, and VDR supports this hypothesis. Mizwicki and Norman described a conformational ensemble model to explain how the same nuclear receptor could perform both genomic pathways and non-genomic, membrane associated effects [8,90]. According to this, the receptor has two ligand binding pockets with different affinities for different ligand conformations. The classic pocket is responsible for the genomic action, the alternative one for the rapid response. So, the receptor could switch between its functions: Access to the classic pocket is controlled by the position of helix-12. How opening of the alternative pocket works is unknown [8]. It is likely, that even the same derivative may have different functions in the same epithelium depending on the conformation of the receptor. In the case of calcitriol the 6-*s-cis* shape prefers the alternative pocket in steady state conditions, whereas the 6-*s-trans* shape prefers the classical pocket under steady state conditions [8]. Not only the conformation or shape of the steroid derivative influences the binding to the receptor. Also the location of the receptor could play an important role.

VDR has been demonstrated in caveolae [85,89], and our results support the idea of a membrane associated nuclear VDR in an epithelium without caveolae [74]. We do not know if the membrane

associated VDR is linked to the membrane via a protein or a trans-membrane structure or if they have a high probability to just accumulate near the membrane. It is possible that the receptor is outside the membrane and the binding to the steroid causes an effect via a second messenger and opening of ion channels. For some steroid receptors like estrogen receptors different splicing variants have been described [91,92]. It is likely that splicing variants have different affinities to the same ligand. They may not be randomly distributed in the cell or in the cell membrane. Another receptors like the membrane-associated receptor protein disulfideisomerase A3 (Pdia3) may also play a role in fast behavioral responses. Pdia3 is known to regulate membrane effects by binding calcitriol in osteoblasts. The signal cascades of this way are well studied [93,94]. If Pdia3 plays a role in the rapid responses of the VNO besides the mVDR remains to be studied. It is also possible, that both receptors are involved.

5. Vitamin D derivatives as potential pheromones

Recent studies showed that various steroid binding globulins and steroid receptors occur in the VNO [53,54,68,95,96]. This includes vitamin D, especially calcitriol the most active vitamin D derivative, which is known to have numerous functions. It is important for brain development [97] but also for the function of the adult nervous system [98]. Maybe vitamin D in the VNO is necessary for development of sensory neurons in the SE. However, DBP and VDR are also in the VNO-SE of adult rats and in the NSE, where no sensory neurons occur [74]. In previous studies we found VDR in rat hypothalamus and in the limbic system, partly colocalized with oxytocin [99,100]. Many studies have already indicated that vitamin D is involved in the control of limbic functions and in some affective disorders [101–103] in humans. Several parts of the VNO seem to be a target for vitamin D. Furthermore, a behavioral study in lizards indicated that provitamin D (7-dehydrocholesterol), a derivative of vitamin D, which occurs mainly in the skin, has pheromone-like properties [80]. The supplementation of dietary vitamin D of male Iberian rock lizards resulted in an increased proportion of provitamin D in femoral secretions. Females detected these changes, distinguished provitamin D from similar steroids and preferred males with more provitamin D in their secretions. A recent study by our group suggested that vitamin D could play a role as a pheromone in dogs. The experimental setting was based on the paradigm developed by Concha et al. [104]. Four concentrations of the

Table 1

Median with the mean deviation of the control sample and the different concentrations of cholecalciferol diluted in mineral oil.

Kind and concentration of sample	Median of the sniffing duration in seconds
Control (mineral oil)	0,7 ± 0,38
cholecalciferol 1:1.000	0,4 ± 1,73
cholecalciferol 1:10.000	0,45 ± 0,38
cholecalciferol 1:100.000	1,15 ± 0,6
cholecalciferol 1:1.000.000	1,85 ± 0,7

vitamin D derivate cholecalciferol diluted in mineral oil were each compared with controls (mineral oil without cholecalciferol). Olfactory sample pairs were put in a distance of 30 cm. The test session was started with a sample pair with the odor of treats in the same experimental setup used for the cholecalciferol samples and controls to motivate and help to familiarize them with the setup. The sample pairs were presented in various orders. Between exposure to the sample pairs there was a short break of about five minutes to avoid short term- and cross-habituation. The observed focus behavior was the sniffing duration. Flehmen-like behavior is very difficult to see in dogs and may just occur as an increased sniffing duration, accompanied by licking, followed by chewing and salivating [105]. The longest median sniffing duration was on the lowest concentration (1:1.000.000) of cholecalciferol (Table 1), i.e. the dogs showed more interest in the low concentration mixtures – an important feature, for example in the detection of hazardous substances including signals of potential harm or very low concentrated signals for sexual communication. Further tests with more dogs, which meet the inclusion criteria are necessary, but in general we can interpret the results of this preliminary test as a tendency for dogs to detect low levels of cholecalciferol via the olfactory system. This would be an important prerequisite for a pheromonal effect.

We need more behavioral tests with other species, including humans, to support our behavioral pretests and morphological data. A further question is why some vitamin D derivatives act as pheromones. It is known, that vitamin D has important functions in the immune system. The normal function of the helper T cells is mediated by calcitriol [106]. So, e.g. the risk of chronic autoimmune diseases increases in case of vitamin D deficiency because calcitriol inhibits the synthesis of proinflammatory cytokines by the T cell type Th1 and stimulates the production of the Th2 cytokines IL-4, which acts anti-inflammatory [106]. Studies of Martin, Lopez and coworkers suggest that a higher excretion of provitamin D in lizards femoral glands indicates a better immune system, because the males do not secrete provitamin D if they do not have it in sufficient quantities [80,107]. The same functions of vitamin D derivatives in regard to the immune system in mammals would support a similar function as a pheromone. More studies, including tests with knockout animals are necessary to define the pheromonal effects and which derivatives of vitamin D could trigger a pheromonal response. Also the molecular mechanisms in the VNO and the possible involvement of other parts of the olfactory system have to be analyzed in the future.

6. Conclusions

The vomeronasal organ is the primary target of steroidal pheromones. Volatile and non-volatile metabolites of steroids e.g. androgens, estrogens, glucocorticoids and perhaps also some vitamin D derivatives enter the VNO and stimulate sensory neurons, which project in most mammals to neurons within the accessory olfactory bulbs. The mechanisms of pheromone uptake and recognition is not yet fully understood. It is clear however that the VNO is an important structure in most vertebrate species in this respect. FMRI studies suggest that a similar situation may exist in humans who apparently are without a well-developed VNO. Given their membrane related associations steroids are a class of potential pheromones of growing interest. However

membrane mechanisms of (rapid) responses of steroidal pheromones in general are still a matter of some debate.

Calciferol influences the function and development of the nervous system and although it primarily seems to act as a neuroprotective substance in the SE, it seems to be a good candidate also for a steroidal pheromone in mammals [26]. The occurrence of vitamin D binding proteins has been shown in various brain regions [73,100] and our preliminary behavioral tests with dogs indicate that this steroid induces differential levels interest in a dose dependent manner. Furthermore, if vitamin D is applied in sufficient quantities to male lizards their provitamin D levels are increased in femoral gland secretions, which are important for scent marking and the attraction of females, indicating functions as a pheromone. Our results suggest that this extend to mammals too.

Acknowledgements

This research was supported by grants from Roche diagnostics and V.M.G. is a recipient of a fellowship.

Ethical statement

Animal experiments were approved by Thuringian state government (protocol # 02-040/10) and by the College of Science Research Ethics Committee, Lincoln, UK (UID CoSREC208).

References

- [1] P. Karlson, M. Luscher, Pheromones: a new term for a class of biologically active substances, *Nature* 183 (1959) 55–56.
- [2] T.D. Wyatt, Fifty years of pheromones, *Nature* 457 (2009) 262–263.
- [3] J. Brechbuhl, et al., Mouse alarm pheromone shares structural similarity with predator scents, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110 (2013) 4762–4767.
- [4] J.L. Hurst, R.J. Beynon, Scent wars: the chemobiology of competitive signalling in mice, *BioEssays* 26 (2004) 1288–1298.
- [5] P. Chamero, et al., Identification of protein pheromones that promote aggressive behaviour, *Nature* 450 (2007) 899–902.
- [6] M. Beato, Gene regulation by steroid hormones, *Cell* 56 (1989) 335–344.
- [7] R. Losel, M. Feuring, M. Wehling, Non-genomic aldosterone action: from the cell membrane to human physiology, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 83 (2002) 167–171.
- [8] A.W. Norman, M.T. Mizwicki, D.P. Norman, Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model, *Nat. Rev. Drug Discov.* 3 (2004) 27–41.
- [9] J.D. Caldwell, A sexual arousability model involving steroid effects at the plasma membrane, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26 (2002) 13–30.
- [10] J.D. Caldwell, et al., Steroid effects at the membrane level on oxytocin systems, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 814 (1997) 282–286.
- [11] J. Brechbuhl, M. Klaey, M.C. Broillet, Gruenberg ganglion cells mediate alarm pheromone detection in mice, *Science* 321 (2008) 1092–1095.
- [12] L. Stowers, T.E. Holy, M. Meister, C. Dulac, G. Koentges, Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2, *Science* 295 (2002) 1493–1500.
- [13] P.A. Brennan, Pheromones and mammalian behavior, in: A. Menini (ed.) *The Neurobiology of Olfaction*, Boca Raton, FL, 2010.
- [14] S.D. Liberles, Mammalian pheromones, *Ann. Rev. Physiol.* 76 (2014) 151–175.
- [15] R. Hudson, H. Distel, Pheromonal release of suckling in rabbits does not depend on the vomeronasal organ, *Physiol. Behav.* 37 (1986) 123–128.
- [16] K.M. Dorries, E. AdkinsRegan, B.P. Halpern, Sensitivity and behavioral responses to the pheromone androstene are not mediated by the vomeronasal organ in domestic pigs, *Brain Behav. Evol.* 49 (1997) 53–62.
- [17] V.S. Mandiyan, J.K. Coats, N.M. Shah, Deficits in sexual and aggressive behaviors in Cnga2 mutant mice, *Nat. Neurosci.* 8 (2005) 1660–1662.
- [18] Z. Wang, et al., Pheromone detection in male mice depends on signaling through the type 3 adenylyl cyclase in the main olfactory epithelium, *J. Neurosci.* 26 (2006) 7375–7379.
- [19] M. Meredith, Vomeronasal organ removal before sexual experience impairs male hamster mating-behavior, *Physiol. Behav.* 36 (1986) 737–743.
- [20] S.S. Winans, J.B. Powers, Olfactory and vomeronasal deafferentation of male hamsters: histological and behavioral analyses, *Brain Res.* 126 (1977) 325–344.
- [21] D.A. Wilson, R.J. Stevenson, The fundamental role of memory in olfactory perception, *Trends Neurosci.* 26 (2003) 243–247.
- [22] J.T. Curtis, Y. Liu, Z. Wang, Lesions of the vomeronasal organ disrupt mating-induced pair bonding in female prairie voles (*Microtus ochrogaster*), *Brain Res.* 901 (2001) 167–174.
- [23] A.N. Clancy, A. Coquelin, F. Macrides, R.A. Gorski, E.P. Noble, Sexual behavior and aggression in male mice: involvement of the vomeronasal system, *J. Neurosci.*

- 4 (1984) 2222–2229.
- [24] T.E. Holy, C. Dulac, M. Meister, Responses of vomeronasal neurons to natural stimuli, *Science* 289 (2000) 1569–1572.
- [25] C. Dulac, A.T. Torello, Molecular detection of pheromone signals in mammals: From genes to behaviour, *Nat. Rev. Neurosci.* 4 (2003) 551–562.
- [26] A.V. Kalueff, P. Tuohimaa, Neurosteroid hormone vitamin D and its utility in clinical nutrition, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 10 (2007) 12–19.
- [27] D.W. Eyles, et al., Developmental vitamin D deficiency causes abnormal brain development, *Psychoneuroendocrinology* 34 (Suppl 1) (2009) S247–S257.
- [28] P.H. Hart, et al., Vitamin D in fetal development: findings from a birth cohort study, *Pediatrics* 135 (2015) e167–e173.
- [29] E.B. Keverne, The vomeronasal organ, *Science* 286 (1999) 716–720.
- [30] K.B. Doving, D. Trotter, Structure and function of the vomeronasal organ, *J. Exp. Biol.* 201 (1998) 2913–2925.
- [31] O.L. Vaccarezza, L.N. Sepich, J.H. Tramezzani, The vomeronasal organ of the rat, *J. Anat.* 132 (1981) 167–185.
- [32] J.E. Kratzing, The fine structure of the sensory epithelium of the vomeronasal organ in suckling rats, *Aust. J. Biol. Sci.* 24 (1971) 787–796.
- [33] J. Kratzing, The structure of the vomeronasal organ in the sheep, *J. Anat.* 108 (1971) 247–260.
- [34] P.C. Barber, G. Raisman, An autoradiographic investigation of the projection of the vomeronasal organ to the accessory olfactory bulb in the mouse, *Brain Res.* 81 (1974) 21–30.
- [35] D. Hofer, D.W. Shin, D. Drenkhahn, Identification of cytoskeletal markers for the different microvilli and cell types of the rat vomeronasal sensory epithelium, *J. Neurocytol.* 29 (2000) 147–156.
- [36] S.A. Elgayar, S.A. Eltony, M.A. Othman, Morphology of non-sensory epithelium during post-natal development of the rabbit vomeronasal organ, *Anat. Histol. Embryol.* 43 (2014) 282–293.
- [37] S.A. Eltony, S.A. Elgayar, Morphology of the non-sensory tissue components in rat aging vomeronasal organ, *Anat. Histol. Embryol.* 40 (2011) 263–277.
- [38] A. Rodewald, D. Gisder, V.M. Gebhart, H. Oehring, G.F. Jirikowski, Distribution of olfactory marker protein in the rat vomeronasal organ, *J. Chem. Neuroanat.* 77 (2016) 19–23.
- [39] C. Zancanaro, C.M. Caretta, F. Merigo, A. Cavaggoni, F. Osculati, alpha-Gustducin expression in the vomeronasal organ of the mouse, *The Eur. J. Neurosci.* 11 (1999) 4473–4475.
- [40] A.S. Mendoza, The mouse vomeronasal glands - a light and electron-microscopic study, *Chem. Sens.* 11 (1986) 541–555.
- [41] D.R. Adams, M.D. Wielkamp, The canine vomeronasal organ, *J. Anat.* 138 (Pt 4) (1984) 771–787.
- [42] J.W. Weeks, S.L. Crowell-Davis, G. Heuser, Preliminary study of the development of the Flehmen response in *Equus caballus*, *Appl. Anim. Behav. Sci.* 78 (2002) 329–335.
- [43] B.L. Hart, M.G. Leedy, Stimulus and hormonal determinants of flehmen behavior in cats, *Hormones Behav.* 21 (1987) 44–52.
- [44] S. Lovari, M. Locati, Temporal relationships, transitions and structure of the behavioral repertoire in male apennine chamois during the rut, *Behaviour* 119 (1991) 77–103.
- [45] J. Ladewig, B.L. Hart, Flehmen and vomeronasal organ function in male goats, *Physiol. Behav.* 24 (1980) 1067–1071.
- [46] J. Ladewig, E.O. Price, B.L. Hart, Flehmen in male goats: role in sexual behavior, *Behav. Neural Biol.* 30 (1980) 312–322.
- [47] B.M. Pause, Are androgen steroids acting as pheromones in humans? *Physiol. Behav.* 83 (2004) 21–29.
- [48] B.L. Grosser, L. Monti-Bloch, C. Jennings-White, D.L. Berliner, Behavioral and electrophysiological effects of androstadienone, a human pheromone, *Psychoneuroendocrinology* 25 (2000) 289–299.
- [49] C.J. Wysocki, G.K. Beauchamp, R.R. Reidinger, J.L. Wellington, Access of large and nonvolatile molecules to the vomeronasal organ of mammals during social and feeding behaviors, *J. Chem. Ecol.* 11 (1985) 1147–1159.
- [50] C.J. Wysocki, J.L. Wellington, G.K. Beauchamp, Access of urinary nonvolatiles to the mammalian vomeronasal organ, *Science* 207 (1980) 781–783.
- [51] L. Monti-Bloch, C. Jennings-White, D.L. Berliner, The human vomeronasal system. A review, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 855 (1998) 373–389.
- [52] K. Grammer, B. Fink, N. Neave, Human pheromones and sexual attraction, *Eur. J. Obst. Gynecol. Reprod. Biol.* 118 (2005) 135–142.
- [53] V. Ploss, V.M. Gebhart, W. Dolz, G.F. Jirikowski, Sex hormone binding globulin in the rat olfactory system, *J. Chem. Neuroanat.* 57–58 (2014) 10–14.
- [54] V.M. Ploss, V.M. Gebhart, D. Gisder, W. Dolz, G.F. Jirikowski, Localization of sex hormone binding globulin in the rat vomeronasal organ, *J. Chem. Neuroanat.* 61–62 (2014) 120–123.
- [55] S. Cherian, Y.W. Lam, I. McDaniels, M. Struziak, R.J. Delay, Estradiol rapidly modulates odor responses in mouse vomeronasal sensory neurons, *Neuroscience* 269 (2014) 43–58.
- [56] R.B. Simerly, C. Chang, M. Muramatsu, L.W. Swanson, Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study, *J. Comp. Neurol.* 294 (1990) 76–95.
- [57] R. Li, J. Cui, Y. Shen, Brain sex matters: estrogen in cognition and Alzheimer's disease, *Mol. Cell. Endocrinol.* 389 (2014) 13–21.
- [58] E. Garcion, N. Wion-Barbot, C.N. Montero-Menei, F. Berger, D. Wion, New clues about vitamin D functions in the nervous system, *Trends Endocrinol. Metab.* 13 (2002) 100–105.
- [59] H.M. Bruce, A block to pregnancy in the mouse caused by proximity of strange males, *J. Reprod. Fertil.* 1 (1960) 96–103.
- [60] A.S. Parkes, H.M. Bruce, Pregnancy-block in female mice placed in boxes soiled by males, *J. Reprod. Fertil.* 4 (1962) 303–308.
- [61] E.K. Roberts, A. Lu, T.J. Bergman, J.C. Beehner, A Bruce effect in wild geladas, *Science* 335 (2012) 1222–1225.
- [62] J.F. Bellringer, H.P.M. Pratt, E.B. Keverne, Involvement of the vomeronasal organ and prolactin in pheromonal induction of delayed implantation in mice, *J. Reprod. Fertil.* 59 (1980) 223–228.
- [63] A. Lloydthomas, E.B. Keverne, Role of the brain and accessory olfactory system in the block to pregnancy in mice, *Neuroscience* 7 (1982) 907–913.
- [64] H.M. Bruce, Effect of castration on reproductive pheromones of male mice, *J. Reprod. Fertil.* 10 (1965) 141–143.
- [65] P.C. Hoppe, Genetic and endocrine studies of pregnancy-blocking pheromone of mice, *J. Reprod. Fertil.* 45 (1975) 109–115.
- [66] I. Savic, H. Berglund, P. Lindstrom, Brain response to putative pheromones in homosexual men, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 (2005) 7356–7361.
- [67] H. Berglund, P. Lindstrom, I. Savic, Brain response to putative pheromones in lesbian women, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (2006) 8269–8274.
- [68] W. Dolz, A. Eitner, J.D. Caldwell, G.F. Jirikowski, Expression of corticosteroid binding globulin in the rat olfactory system, *Acta Histochem.* 115 (2013) 376–381.
- [69] E.V. Sivukhina, G.F. Jirikowski, H.G. Bernstein, J.G. Lewis, Z. Herbert, Expression of corticosteroid-binding protein in the human hypothalamus, co-localization with oxytocin and vasopressin, *Hormone Metab. Res. = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* 38 (2006) 253–259.
- [70] M. Heinrichs, T. Baumgartner, C. Kirschbaum, U. Ehler, Social support and oxytocin interact to suppress cortisol and subjective responses to psychosocial stress, *Biol. Psychiatry* 54 (2003) 1389–1398.
- [71] D.D. Bikle, et al., Assessment of the free fraction of 25-hydroxyvitamin-D in serum and its regulation by albumin and the vitamin-D-binding protein, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 63 (1986) 954–959.
- [72] M. Speckaert, G.M. Huang, J.R. Delanghe, Y.E.C. Taes, Biological and clinical aspects of the vitamin D binding protein (Gc-globulin) and its polymorphism, *Clin. Chim. Acta* 372 (2006) 33–42.
- [73] G. Jirikowski, U. Kauntz, A. Dief, J. Caldwell, Distribution of vitamin D binding protein expressing neurons in the rat hypothalamus, *Histochem. Cell Biol.* 131 (2009) 365–370.
- [74] A. Rodewald, V.M. Gebhart, H. Oehring, G.F. Jirikowski, The rat vomeronasal organ is a vitamin D target, *J. Chem. Neuroanat.* 81 (2017) 42–47.
- [75] D.J. Mangelsdorf, et al., The nuclear receptor superfamily: the second decade, *Cell* 83 (1995) 835–839.
- [76] Y.J. Wang, J.G. Zhu, H.F. Deluca, Where is the vitamin D receptor? *Arch. Biochem. Biophys.* 523 (2012) 123–133.
- [77] L. Yang, J.F. Ma, X.L. Zhang, Y. Fan, L.N. Wang, Protective role of the vitamin D receptor, *Cell. Immunol.* 279 (2012) 160–166.
- [78] A.W. Norman, Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor, *Endocrinology* 147 (2006) 5542–5548.
- [79] M.R. Haussler, P.W. Jurutka, M. Mizwicki, A.W. Norman, Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1alpha,25(OH)(2)vitamin D(3): genomic and non-genomic mechanisms, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 25 (2011) 543–559.
- [80] J. Martin, P. Lopez, Vitamin D supplementation increases the attractiveness of males' scent for female Iberian rock lizards, *Proc. Biol. Sci.* 273 (2006) 2619–2624.
- [81] R. Tirindelli, M. Dibattista, S. Pifferi, A. Menini, From pheromones to behavior, *Physiol. Rev.* 89 (2009) 921–956.
- [82] C. Carlberg, M.J. Campbell, Vitamin D receptor signaling mechanisms: integrated actions of a well-defined transcription factor, *Steroids* 78 (2013) 127–136.
- [83] J.D. Caldwell, et al., Emerging roles of steroid-binding globulins, *Hormone Metab. Res. = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* 38 (2006) 206–218.
- [84] I. Nemere, L.X. Zhou, A.W. Norman, Nontranscriptional effects of steroid hormones, *Receptor* 3 (1993) 277–291.
- [85] A.W. Norman, C.J. Olivera, F.R. Barreto Silva, J.E. Bishop, A specific binding protein/receptor for 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) is present in an intestinal caveolae membrane fraction, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 298 (2002) 414–419.
- [86] L. Li, M.P. Haynes, J.R. Bender, Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor alpha variant (ER46) in human endothelial cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003) 4807–4812.
- [87] L.B. Lutz, et al., Selective modulation of genomic and nongenomic androgen responses by androgen receptor ligands, *Mol. Endocrinol.* 17 (2003) 1106–1116.
- [88] I. Nemere, M.C. Dormanen, M.W. Hammond, W.H. Okamura, A.W. Norman, Identification of a specific binding protein for 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 in basal-lateral membranes of chick intestinal epithelium and relationship to transcaltachia, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 23750–23756.
- [89] J.A. Huhtakangas, C.J. Olivera, J.E. Bishop, L.P. Zanello, A.W. Norman, The vitamin D receptor is present in caveolae-enriched plasma membranes and binds 1 alpha,25(OH)(2)-vitamin D3 in vivo and in vitro, *Mol. Endocrinol.* 18 (2004) 2660–2671.
- [90] M.T. Mizwicki, A.W. Norman, The vitamin D sterol-vitamin D receptor ensemble model offers unique insights into both genomic and rapid-response signaling, *Sci. Signal.* 2 (2009) re4.
- [91] Q.X. Zhang, S.G. Hilsenbeck, S.A.W. Fuqua, A. Borg, Multiple splicing variants of the estrogen receptor are present in individual human breast tumors, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 59 (1996) 251–260.
- [92] A. Bolling, R.J. Miksicsek, An estrogen receptor-alpha splicing variant mediates both positive and negative effects on gene transcription, *Mol. Endocrinol.* 14 (2000) 634–649.
- [93] M. Doroudi, R. Olivares-Navarrete, B.D. Boyan, Z. Schwartz, A review of 1 alpha,25(OH)(2)D-3 dependent Pdia3 receptor complex components in Wnt5a

- non-canonical pathway signaling, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 152 (2015) 84–88.
- [94] J.X. Chen, et al., Protein-disulfide Isomerase-associated 3 (Pdia3) Mediates the Membrane Response to 1,25-Dihydroxyvitamin D-3 in Osteoblasts, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 37041–37050.
- [95] O.V. Alekseyenko, M.J. Baum, J.A. Cherry, Sex and gonadal steroid modulation of pheromone receptor gene expression in the mouse vomeronasal organ, *Neuroscience* 140 (2006) 1349–1357.
- [96] D.L. Berliner, L. MontiBloch, C. JenningsWhite, V. DiazSanchez, The functionality of the human vomeronasal organ (VNO): evidence for steroid receptors, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 58 (1996) 259–265.
- [97] J.J. McGrath, F.P. Feron, T.H.J. Burne, A. Mackay-Sim, D.W. Eyles, Vitamin D-3 - implications for brain development, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 89–90 (2004) 557–560.
- [98] L.R. Harms, T.H.J. Burne, D.W. Eyles, J.J. McGrath, Vitamin D and the brain, *Best Prac. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 25 (2011) 657–669.
- [99] K. Prufer, G.F. Jirikowski, 1,25-dihydroxyvitamin D-3 receptor is partly colocalized with oxytocin immunoreactivity in neurons of the male rat hypothalamus, *Cell. Mol. Biol.* 43 (1997) 543–548.
- [100] K. Prufer, T.D. Veenstra, G.F. Jirikowski, R. Kumar, Distribution of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor immunoreactivity in the rat brain and spinal cord, *J. Chem. Neuroanat.* 16 (1999) 135–145.
- [101] D.J. Armstrong, G.K. Meenagh, I. Bickle, A.S. Lee, M.M. Finch, Relationship between vitamin D levels and depression score in fibromyalgia, *Rheumatology* 45 (2006) 184.
- [102] V. Ganji, C. Milone, M.M. Cody, F. McCarty, Y.T. Wang, Serum vitamin D concentrations are related to depression in young adult US population: the Third National Health and Nutrition Examination Survey, *Int. Arch. Med.* 3 (2010) 29.
- [103] R. Jorde, K. Waterloo, F. Saleh, E. Haug, J. Svartberg, Neuropsychological function in relation to serum parathyroid hormone and serum 25-hydroxyvitamin D levels - The Tromsø study, *J. Neurol.* 253 (2006) 464–470.
- [104] A. Concha, et al., Using sniffing behavior to differentiate true negative from false negative responses in trained scent-detection dogs, *Chem. Sens.* 39 (2014) 749–754.
- [105] D. Berthoud, C. Nevison, J. Waterhouse, D. Hawkins, The effect of castrating male dogs on their use of the vomeronasal organ when investigating conspecific urine deposits, *J. Vet. Behav.* 8 (2013) e40.
- [106] F. Baeke, T. Takiishi, H. Korf, C. Gysemans, C. Mathieu, Vitamin D: modulator of the immune system, *Curr. Opin. Pharmacol.* 10 (2010) 482–496.
- [107] P. Lopez, J. Martin, Female Iberian wall lizards prefer male scents that signal a better cell-mediated immune response, *Biol. Lett.* 1 (2005) 404–406.

5 Publikation in Vorbereitung: Olfaktorische Untersuchungen mit Provitamin D an Hunden und Wölfen

5.1 Einleitung

Nach den ersten olfaktorischen Tests mit Cholecalciferol, die sich methodisch nach dem Versuchsaufbau von Concha et al. (Concha et al. 2014) richteten, wurden weitere Untersuchungen mit Provitamin D an verschiedenen Hunderassen und Wölfen durchgeführt. Hierfür wurde der Versuchsaufbau optimiert und vereinfacht. Die Tests dienen als Voruntersuchung einer größeren Studie, in der die Wirkung verschiedenster Steroidderivate untersucht und verglichen werden soll. Über die Vortests soll zunächst nur die Frage geklärt werden, ob Säugetiere Provitamin D über ihr Geruchssystem wahrnehmen können.

5.2 Material und Arbeitstechniken

In den Voruntersuchungen wurden verschiedene Provitamin D-Konzentrationen getestet. Im ersten Durchlauf wurden 1:10.000 ($2,6 \times 10^{-4}$ mol/l), 1:100.000 ($2,6 \times 10^{-5}$ mol/l) und 1:1Mio ($2,6 \times 10^{-6}$ mol/l) an neun Hunden unterschiedlicher Rassen, die aus Privathaushalten stammen, getestet (Tab 1). Im zweiten Durchlauf wurden die Konzentrationen 1:1.000 ($2,6 \times 10^{-3}$ mol/l), 1:10.000 ($2,6 \times 10^{-4}$ mol/l) und 1:100.000 ($2,6 \times 10^{-5}$ mol/l) an neun Wölfen der Art *Canis lupus lycaon* im Wolfsforschungszentrum in Ernstbrunn (Österreich) getestet (Abb. 6B). Das Provitamin D wurde in 90 % Ethanol gelöst. Jedes Individuum nahm an sechs Durchgängen teil.

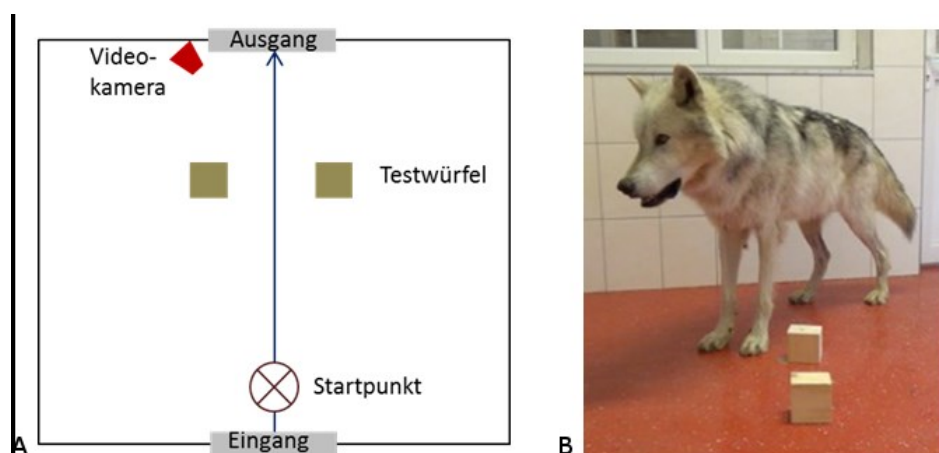


Abb. 6: A: Versuchsaufbau im Testraum für die olfaktorischen Tests mit Wölfen und Hunden. B: Wolf im Testraum Ernstbrunn.

In jedem Durchgang wurden zwei neue unverleimte Fichtenholzblöcke mit den Maßen 10 cm x 10 cm in einem Testraum im Abstand von 30 cm aufgebaut (Abb. 6A). Einer der Holzblöcke wurde mit einer Konzentration von Provitamin D behandelt, der andere wurde lediglich mit Ethanol ohne Provitamin D als Kontrolle behandelt. Die Holzblöcke wurden vor den Versuchen in einem Heraeus Heißluftsterilisator SUT 6060 für 30 Minuten bei 150°C erhitzt. Um das Risiko einer Kontamination mit Fremdgerüchen gering zu halten, wurden sie anschließend nur noch mit Einweghandschuhen berührt, präpariert und aufgebaut. Über Videokamera wurden alle Tests dokumentiert. Die Hunde wurden in einem Raum der Größe 4 m x 4 m im Max-Planck-Institut Jena und die Wölfe in einem Raum von 3 m x 3 m im Wolfsforschungszentrum Ernstbrunn getestet. Alle Individuen waren unkastriert und bereits geschlechtsreif (Tab. 1).

Tab. 1: Auflistung der Versuchstiere, die an den olfaktorischen Tests mit Provitamin D teilnahmen.

Art, Rasse	Geschlecht	Geburts- datum/-jahr	spezielles Training, Vereine/Tierparks	Testzeit- raum
<i>Canis lupus familiaris</i>				
Border Collie	Männchen	21.01.2016	Begleithundeprüfung	16.02.2017
Cocker Spaniel Mix	Männchen	2010	-	07.03.2017
Drahthaar Vizsla	Männchen	2013	Hundesportverein	07.03.2017
Mops	Männchen	unbekannt	-	08.03.2017
Whippet	Männchen	28.08.2010	-	08.03.2017
Border Collie	Weibchen	13.04.2013	-	07.03.2017
Altdeutscher Hütehund	Weibchen	21.04.2001	Rettungshund	07.03.2017
Podenco Mix	Weibchen	2007	-	08.03.2017
Labrador	Weibchen	23.11.2007	-	10.03.2017
<i>Canis lupus lycaon</i>				
	Männchen	2008	Wolf Science Center	15.05.2017
	Männchen	2009	Wolf Science Center	15.05.2017
	Männchen	2008	Wolf Science Center	16.05.2017
	Männchen	2009	Wolf Science Center	16.05.2017
	Männchen	2012	Wolf Science Center	16.05.2017
	Weibchen	2008	Wolf Science Center	15.05.2017
	Weibchen	2009	Wolf Science Center	15.05.2017
	Weibchen	2012	Wolf Science Center	16.05.2017
	Weibchen	04.05.2016	Wolf Science Center	17.05.2017

Der jeweils erste und vierte Durchgang diente dazu, die Tiere mit dem Versuchsablauf vertraut zu machen bzw. als Motivationsdurchgang. In diesen Tests wurde lediglich Futter auf die Blöcke gelegt. In den anderen Durchgängen wurden die Holzblöcke mit je 0,5 ml einer Lösung präpariert. In drei Holzblockpaarungen wurde eine der Provitamin D-Konzentration dem reinen Lösungsmittel Ethanol gegenübergestellt, dabei wurde jedes Individuum auf jede Konzentration einmal getestet. Das vierte Holzblockpaar enthielt zwei Kontrollen und keine Provitamin D-Probe. Die Reihenfolge und die Blockaufstellung (d.h. auf welcher Seite sich das Provitamin D befindet) wurden so bestimmt, dass die Reihenfolge der Konzentrationen variierte. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Vitamin D-Probe in jedem Durchgang abwechselnd auf den linken bzw. rechten Block gegeben wurde. Die Reihenfolge wurde so für das erste Versuchstier festgelegt und anschließend im Uhrzeigersinn rotiert (Tab. 2).

Tab. 2: Reihenfolge und Anordnung der präparierten Versuchsblöcke für jeweils 5 Männchen und Weibchen. Test 1 und Test 2 beinhalten jeweils drei Versuchsdurchgänge, zwischen beiden liegt eine größere Pause von 15 Minuten (Pausen: kursiv geschrieben). In einem Versuchsdurchgang wurden zwei Holzblöcke im Abstand von 30 cm aufgestellt. Zwischen den einzelnen Durchgängen wurde für 5 Minuten pausiert. Abkürzungen: W - Weibchen, M - Männchen, F - Futter, K - Kontrolle, VD 1 - Provitamin D Konzentration 1:1.000 (Wölfe) bzw. 1:10.000 (Hunde), VD2 - Provitamin D Konzentration 1:10.000 (Wölfe) bzw. 1:100.000 (Hunde), VD3 - Provitamin D Konzentration 1:100.000 (Wölfe) bzw. 1:1Mio (Hunde).

W 1		W 2		W 3		W 4		W 5	
Test 1	Test 2	Test 1	Test 2	Test 1	Test 2	Test 1	Test 2	Test 1	Test 2
F - F	F - F	F - F	F - F	F - F	F - F	F - F	F - F	F - F	F - F
<i>5 min</i>	<i>5 min</i>	<i>5 min</i>	<i>5 min</i>	<i>5 min</i>	<i>5 min</i>	<i>5 min</i>	<i>5 min</i>	<i>5 min</i>	<i>5 min</i>
VD3-K	K-VD1	K - K	K-VD3	K-VD2	K - K	K-VD1	K-VD2	VD3-K	K - K
<i>5 min</i>	<i>5 min</i>	<i>5 min</i>	<i>5 min</i>	<i>5 min</i>	<i>5 min</i>	<i>5 min</i>	<i>5 min</i>	<i>5 min</i>	<i>5 min</i>
K - K	VD2-K	VD2-K	VD1-K	VD1-K	K-VD3	VD3-K	K - K	K-VD2	VD1-K
<i>15 min</i>		<i>15 min</i>		<i>15 min</i>		<i>15 min</i>		<i>15 min</i>	
M 1		M 2		M 3		M 4		M 5	
Test 1	Test 2	Test 1	Test 2	Test 1	Test 2	Test 1	Test 2	Test 1	Test 2
F - F	F - F	F - F	F - F	F - F	F - F	F - F	F - F	F - F	F - F
<i>5 min</i>	<i>5 min</i>	<i>5 min</i>	<i>5 min</i>	<i>5 min</i>	<i>5 min</i>	<i>5 min</i>	<i>5 min</i>	<i>5 min</i>	<i>5 min</i>
VD3-K	K-VD1	K - K	K-VD3	K-VD2	K - K	K-VD1	K-VD2	VD3-K	K - K
<i>5 min</i>	<i>5 min</i>	<i>5 min</i>	<i>5 min</i>	<i>5 min</i>	<i>5 min</i>	<i>5 min</i>	<i>5 min</i>	<i>5 min</i>	<i>5 min</i>
K - K	VD2-K	VD2-K	VD1-K	VD1-K	K-VD3	VD3-K	K - K	K-VD2	VD1-K
<i>15 min</i>		<i>15 min</i>		<i>15 min</i>		<i>15 min</i>		<i>15 min</i>	

Zwischen den einzelnen Durchgängen wurde fünf Minuten und zwischen dem dritten und vierten Durchgang mindestens 15 Minuten pausiert um Habituationen zu vermeiden. Sollte ein Tier in einem Raum Markierungsverhalten gezeigt haben, wurde der Raum mit desinfizierenden Reinigungsmitteln gesäubert. Die Tiere konnten den Testraum für 90 Sekunden einzeln und ohne Leine erkunden.

Im Anschluss wurden die Riechzeiten millisekundengenau mit dem Programm avidemux 2.7.0 ermittelt. Es wurden die Riechzeiten mit direktem Kontakt zu den Holzwürfeln gemessen. Das Riechen an einem Würfel wurde als ein einzelnes Ereignis gewertet, wenn die Unterbrechung des Verhaltens nicht länger als 1 Sekunde betrug. Der Abstand zum Testwürfel betrug dann maximal eine Nasenrückenlänge des jeweils getesteten Hundes während der Unterbrechung. In anderen Fällen wurden zwei Ereignisse notiert.

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm IBM SPSS Statistics Version 21.0.0.1. Damit wurden die Mediane der Riechzeiten an den einzelnen Konzentrationen ermittelt und die Boxplotdiagramme erstellt. Um zu testen, ob die Riechzeiten an den Provitamin D-Proben sich signifikant von denen an den Kontrollen mit Ethanol unterscheiden, wurde der Wilcoxon-Test genutzt (Lam und Longnecker 1983, Higgins 2003), da dieser für nicht-parametrische Daten und kleine, abhängige Stichproben geeignet ist. Die Auswertung der Daten (Riechzeiten, Geschlechtervergleich) fand innerhalb der Spezies statt.

5.3 Ergebnisse

Zunächst wurde betrachtet, wie oft ein direkter Kontakt zu den mit Provitamin D behandelten Blöcken zustande kam. Im Test mit den Hunden hatten von den Rüden 67 % und von den Hündinnen 50 % direkten Kontakt zu den mit Provitamin D-behandelten Blöcken. Von den Wolfsmännchen konnte in 80 % der Fälle, von den Weibchen in 67 % der Fälle ein direkter Kontakt zu den mit Provitamin D-behandelten Blöcken beobachtet werden. In den anderen Fällen hatten die Tiere nur zu den Kontrollen direkten Kontakt.

Von den zustande gekommenen direkten Kontakten zu den Holzblöcken wurde anschließend betrachtet, ob die Tiere von dem angebotenen Holzblockpaar zuerst den Provitamin D-behandelten oder den Kontrollblock ohne Provitamin D auswählten (Abb. 7). 72,7 % der Rüden hatten den Erstkontakt mit den Provitamin D behandelten Blöcken. In der genaueren Betrachtung sind 50 % der Rüden zuerst auf die Provitamin D-Konzentration 1:10.000 (VD1), alle Rüden zuerst auf 1:100.000 (VD2) und 50 % zuerst

auf 1:1Mio (VD3) zugegangen (alle Konzentrationen im Vergleich zur Provitamin D-freien Kontrolle mit 90 % Ethanol) (Abb. 7). Bei den Hündinnen fand der Erstkontakt in der Gesamtbewertung in 12,5 % der Ereignisse an den Provitamin D-behandelten Blöcken statt. In 33,3 % der Ereignisse fand der Erstkontakt an 1:10.000 statt, bei den Durchgängen mit den niedrigeren Konzentrationen fand der Erstkontakt mit der Kontrolle statt.

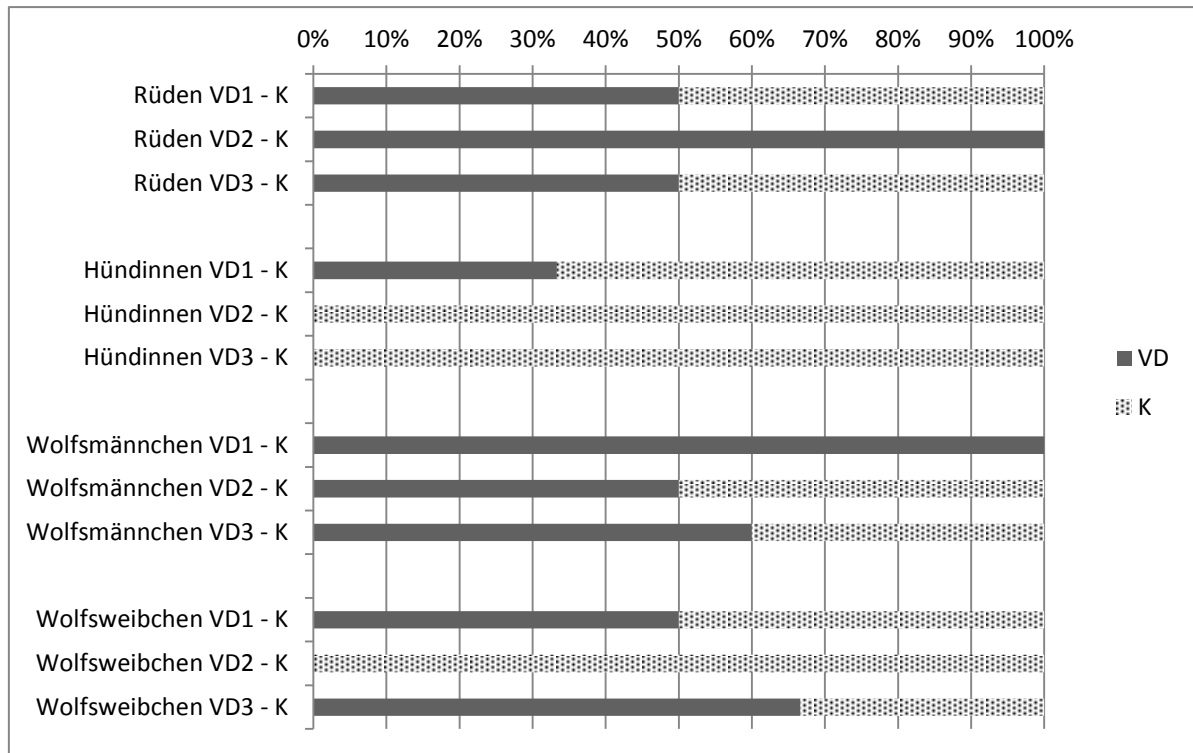


Abb. 7: Erstkontakte in Abhängigkeit der Spezies und des Geschlechts: Auf welchen Block gingen die Individuen zuerst zu - den Vitamin D-Block oder Kontrollblock? Abkürzungen: VD1 – Provitamin D-Konzentration 1:1.000 (Wölfe) bzw. 1:10.000 (Hunde), VD2 - Provitamin D-Konzentration 1:10.000 (Wölfe) bzw. 1:100.000 (Hunde), VD3 - Provitamin D-Konzentration 1:100.000 (Wölfe) bzw. 1:1Mio (Hunde), K - Kontrollen mit 90 % Ethanol, VD - Provitamin D-Probe.

In 69,2 % der Tests mit den Wolfsmännchen fand der Erstkontakt an den Provitamin D-Proben statt und nicht an den Kontrollen mit Ethanol. Davon fanden 100 % der Erstkontakte an der Provitamin D-Konzentration 1:1.000 (VD1), 50 % an 1:10.000 (VD2) und 60 % an 1:100.000 (VD3) statt. In 44,4 % der Tests mit den Wolfsw weibchen fand der erste Kontakt an den Provitamin D-behandelten Blöcken statt. Davon fanden 50 % an der Provitamin D-Konzentration 1:1.000 und 67 % an 1:100.000 statt. An der Konzentration 1:10.000 wurde in keinem Test mit den Wolfsw weibchen ein Erstkontakt aufgenommen.

Die Riechdauern an den Provitamin D Konzentrationen wurden in den Abb. 8 - 10 für die Hunde und Wölfe separat in Boxplotdiagrammen dargestellt und mit der jeweiligen Ethanolkontrolle verglichen. Bei der Betrachtung des Interquartilbereichs zeigte sich, dass die Hündinnen tendenziell länger an den Provitamin D-Proben rochen. Der Vergleich der Mediane ergab mit 2,52 s für VD2 eine längere Riechzeit an Provitamin D als an der Kontrolle (1,12 s), während der Median der anderen Provitamin D-Konzentrationen unter dem der Kontrollen lag (Abb. 8). Die Rüden hatten mit einem Median von 1,48 s an der Konzentration 1:1Mio eine längere mittlere Riechdauer an Provitamin D als an der Kontrolle mit einem Median von 0,64 s (Abb. 8). Die Wolfsmännchen zeigten an der höchsten Provitamin D-Konzentration generell die längste Riechdauer (Median: 0,9 s). Im Vergleich dazu betrug der Median der Riechdauer an der Kontrolle 0,05 s (Abb. 9). Auch an der niedrigsten Konzentration konnte eine längere Riechzeit (Median: 0,58 s) als an der Kontrolle (Median: 0,42 s) beobachtet werden. Die Wolfsweibchen zeigten an der höchsten Konzentration 1:1.000 (Median VD1: 0,57 s, Median Kontrolle: 0,29 s) und an der Konzentration von 1:10.000 (Median VD2: 0,37 s, Median Kontrolle: 0,13 s) längere Riechdauern als an den Kontrollen (Abb. 9).

Im Geschlechtervergleich konnte beobachtet werden, dass Wolfsmännchen an den Konzentrationen 1:1.000 und 1:100.000 tendenziell länger rochen als Wolfsweibchen (Abb. 10). Rüden zeigten eine kürzere Riechzeit an der Konzentration 1:10.000 und 1:100.000 als die Hündinnen. An der geringsten Konzentration zeigten sie eine längere Riechzeit als die Hündinnen. Die Unterschiede zwischen den Riechdauern an den Provitamin D-Proben und denen an den Kontrollblöcken waren nicht signifikant (Signifikanzniveau bei 0,05) (Tab. 3).

Flehmen konnte weder bei den Hunden noch bei den Wölfen beobachtet werden.

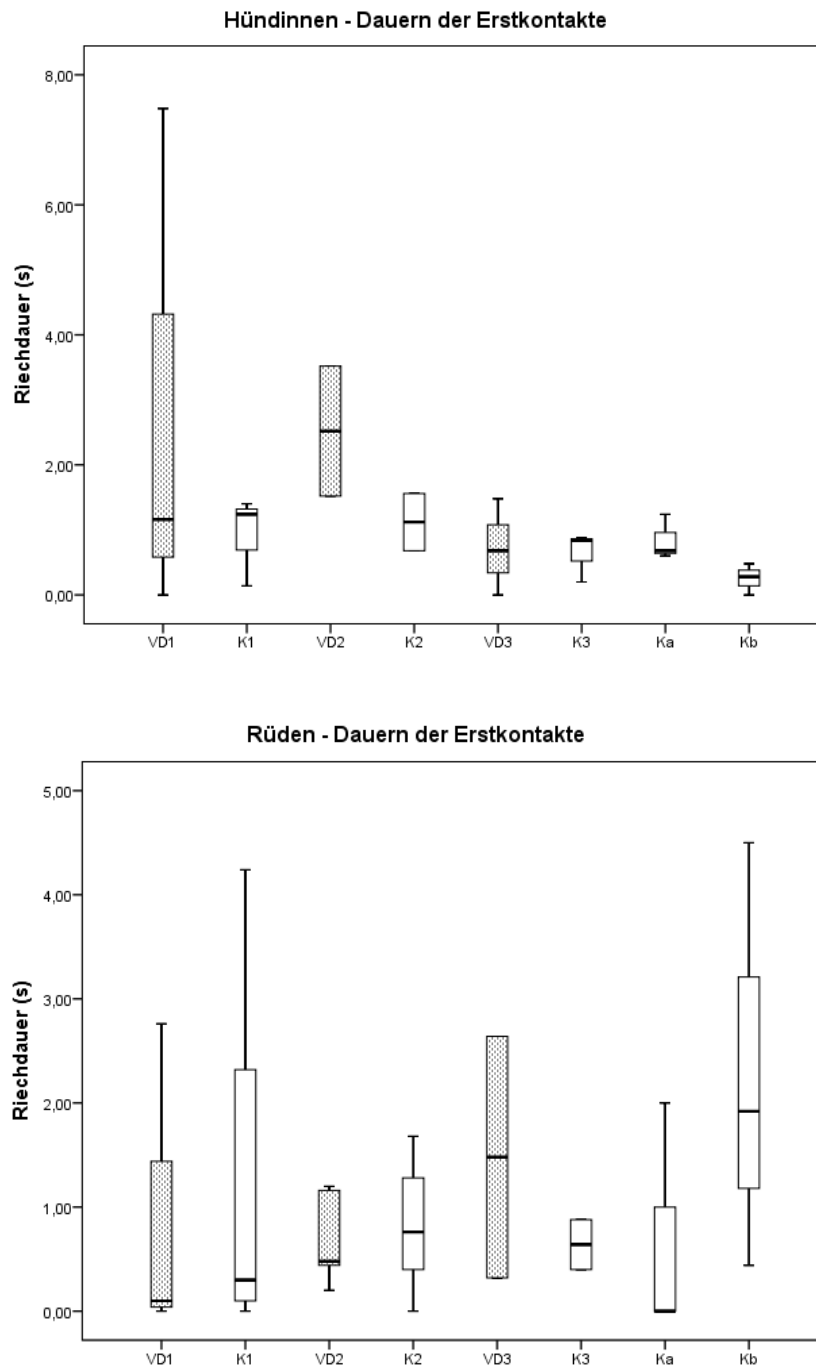


Abb. 8: Boxplotdiagramme über die Riechzeiten der Hündinnen und Rüden an den Provitamin D-Konzentrationen 1:10.000 (VD1), 1:100.000 (VD2) und 1:1 Mio (VD3). Im direkten Vergleich dazu sind die Riechzeiten an den Kontrollen mit 90% Ethanol (K1, K2, K3) dargestellt. Jedes Individuum wurde für die drei Konzentrationen (gepaart mit je einer Kontrolle) und einem Blockpaar, der lediglich zwei Kontrollen enthielt (Ka und Kb) getestet.

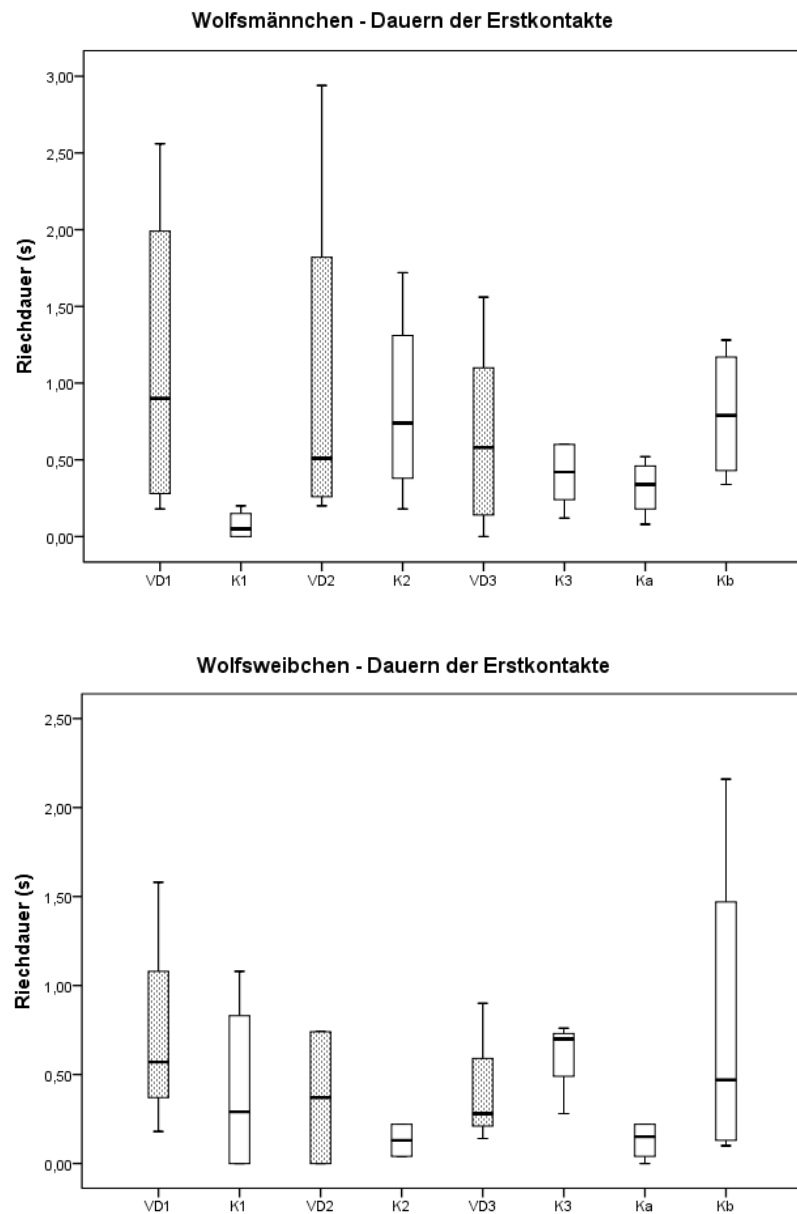


Abb. 9: Riechzeiten, die die Wölfe an den Provitamin D-Konzentrationen 1:1.000 (VD1), 1:10.000 (VD2) und 1:100.000 (VD3) zeigten. Im direkten Vergleich dazu sind die Riechzeiten an den Kontrollen (K1, K2, K3) dargestellt. Jedes Individuum wurde für die drei Konzentrationen (gepaart mit je einer Kontrolle) und einem Blockpaar, der lediglich zwei Kontrollen enthielt (Ka und Kb) getestet.

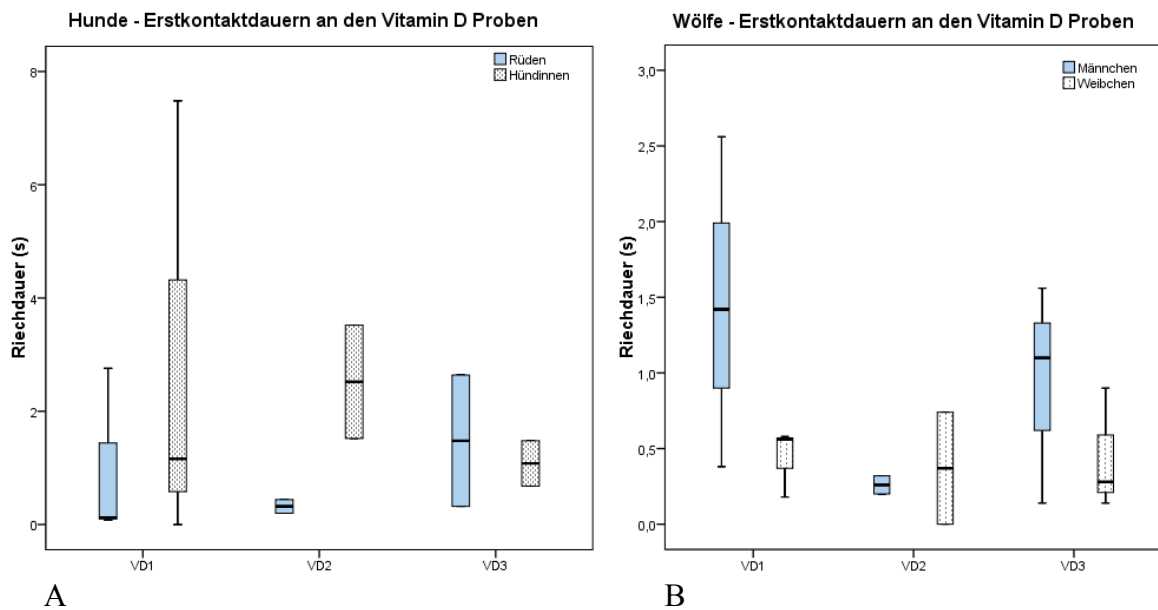


Abb. 10: Geschlechtervergleich: A: Riechzeiten der Rüden im Vergleich zu den Riechzeiten der Hündinnen für die drei Provitamin D-Konzentrationen VD1 (1:10.000), VD2 (1:100.000) und VD3 (1:1Mio). B: Riechzeiten der Wolfsmännchen im Vergleich zu den Riechzeiten der Wolfswelbchen für die drei Provitamin D-Konzentrationen VD1 (1:1.000), VD2 (1:10.000) und VD3 (1:100.000).

Tab. 3: Wilcoxon-Signifikanztests: Vergleichend getestet wurden die Riechdauern an den Provitamin D-Blöcken und an den Kontrollblöcken im selben Testdurchgang. Gewertet wurden alle Durchgänge, in denen die Tiere Kontakt zu mindestens einem der beiden Holzblöcke hatten. Abkürzungen: VD1 – Provitamin D-Konzentration 1:1.000 (Wölfe) bzw. 1:10.000 (Hunde), VD2 - Provitamin D-Konzentration 1:10.000 (Wölfe) bzw. 1:100.000 (Hunde), VD3 - Provitamin D-Konzentration 1:100.000 (Wölfe) bzw. 1:1Mio (Hunde), K - Kontrollen mit 90 % Ethanol. Signifikanzniveau: 0,05.

	Durchgang	Signifikanz	Standardfehler	Stichprobenzahl
Wolfsmännchen	VD1 – K1	0,068	2,739	4
	VD2 – K2	1	2,739	4
	VD3 – K3	0,5	3,708	5
Wolfswelbchen	VD1 – K1	0,109	1,871	4
	VD2 – K2	0,655	1,118	2
	VD3 – K3	0,414	1,837	3
Rüden	VD1 – K1	0,144	2,739	4
	VD2 – K2	0,893	3,708	5
	VD3 – K3	0,655	1,118	2
Hündinnen	VD1 – K1	1	1,871	3
	VD2 – K2	0,655	1,118	2
	VD3 – K3	1	1,871	3

6 Diskussion

6.1 Das olfaktorische Markerprotein im Vomeronasalorgan

Das OMP wurde bereits von einigen Autoren in den primären Sinneszellen des olfaktorischen Systems verschiedener Spezies beschrieben (Farbman und Margolis 1980, Fleischer et al. 2006, Bock et al. 2009). Die Funktionen von OMP sind weitgehend unbekannt. Seine Nutzung als Markerprotein für olfaktorische Sinneszellen ist jedoch weit verbreitet, obwohl OMP bereits in anderen Geweben wie in der Schilddrüse oder im Herzen der Maus gefunden wurde (Kang et al. 2015). OMP spielt bei der Funktion und Ausbildung der primären Sinneszellen im olfaktorischen Epithel eine wichtige Rolle. Buiakova et al. zeigten, dass der Geruchssinn von OMP-knockout-Mäusen (*omp*^{-/-}) durch eine Reduktion der Aktivität der Sinneszellen und des olfaktorischen Bulbus beeinträchtigt war (Buiakova et al. 1996). Laut einer weiteren Studie ist OMP bei der Entwicklung und Regeneration olfaktorischer Sinneszellen beteiligt (Lee et al. 2011): Bei der Maus konnte die Präferenz für das eigene Muttertier nur in Wildtyp-Jungtieren beobachtet werden, wohingegen *omp*^{-/-} Knockout Tiere keine olfaktorische Präferenz zeigten.

Im VNO sind ebenfalls OMP-positive primäre Sinneszellen im SE histologisch beschrieben (Barrios et al. 2014c). Auch eine intrinsische Expression im VNO wurde gezeigt (Sasuga et al. 2013). Meine morphologischen Ergebnisse für das VNO der Ratte bestätigen dieses Verteilungsmuster im SE (Rodewald et al. 2016). Die primären Sinneszellen im SE zeigten eine OMP-positive immunhistochemische Färbung. Die Verteilung von OMP in den Dendriten und den Perikarya deutet auf eine intrinsische Expression hin, wie sie auch im olfaktorischen Epithel stattfindet. Über die Dendriten gelangt das OMP dann zu den apikalen dendritischen Vorwölbungen. Auch in den vomeronasalen Drüsen wurde eine granuläre Färbung im Plasma der sekretorischen Zellen und vereinzelt eine Anfärbung der apikalen Mikrovilli des Drüsenepithels beobachtet. Die Färbung der Mikrovilli und Zilien im gesamten VNO könnte von der Sekretion von OMP aus dem Drüsengewebe in das vomeronasale Lumen stammen. Das Drüsensekret im vomeronasalen Gang ist essentiell zur Detektion nicht- oder gering-volatiler Substanzen, die über den Pumpmechanismus des VNOs über das Sekret aufgenommen und darüber zu den sensorisch aktiven Zellen transportiert werden. Wenn dieses Sekret ebenfalls OMP enthält, könnte OMP wahrscheinlich auch am Transport von bestimmten Liganden über das Lumen beteiligt sein. Die Färbung der Mikrovilli und der dendritischen Vorwölbungen legt nahe, dass OMP auch an der Aufnahme über die Membran beteiligt ist.

Das OMP könnte demzufolge nicht nur bei der Entwicklung von primären Sinneszellen und der Detektion von Geruchsstoffen im olfaktorischen Epithel eine Rolle spielen. Auch bei der Aufnahme bzw. dem Transport von Molekülen mit Pheromonfunktion im VNO hat OMP vermutlich eine zentrale Bedeutung. Da die meisten Liganden, die über das VNO wahrgenommen werden nicht volatil sind, ist es denkbar, dass OMP besonders die Aufnahme dieser unterstützt. Verhaltensbiologische Experimente mit *omp*^{-/-} Knockout-Tieren könnten diese Interpretationen bestätigen.

Auch im NSE der adulten Ratte konnten im Rahmen meiner Studie einzelne OMP-positive Zellen beobachtet werden (Rodewald et al. 2016). Im VNO der Maus wurden bereits vom pränatalen E14-Stadium bis zur ersten postnatalen Woche OMP-positive Zellen beobachtet (Tarozzo et al. 1998). Hierbei handelt es sich um neuronale Zellen, die während der späteren Entwicklung wieder verschwinden. In neugeborenen Mongozmakis (*Eulemur mongoz*), einer Primatenart aus der Gattung der großen Makis, wurden ebenfalls einzelne OMP-positive Zellen im NSE nachgewiesen (Smith et al. 2011). Andere Autoren, die das SE von Mäusen untersuchten, zeigten Markierungen, in denen auch in adulten Tieren einzelne OMP-positive Bereiche im NSE sichtbar waren (Barrios et al. 2014c). Die Ergebnisse dieser Studie wurden bis dahin allerdings nicht diskutiert. Färbungen, die ich im Rahmen meiner Arbeit an VNOs von adulten Mäusen durchführte, bestätigten diese Ergebnisse (nicht publiziert). Das Auftreten von OMP in adulten Tieren innerhalb ausgereifter Epithelien und außerhalb von Regenerationszonen zeigt, dass die Funktionen von OMP über Regeneration und Entwicklung hinausgehen. Warum aber kommt OMP, welches normalerweise assoziiert mit Sinneszellen exprimiert wird, im NSE vor?

Die Funktionen des NSEs sind bis jetzt nicht völlig geklärt. In wenigen Zellen des NSEs der Ratte erschien bei meinen Färbungen das OMP granulär. Elektronenmikroskopische Bilder bestätigten das Vorkommen von vesikelreichen Zellen im NSE. Dies deutet darauf hin, dass OMP entweder vesikulär aufgenommen wird oder hier selbst synthetisiert und ggf. in das Lumen abgegeben wird. Bereits frühere Studien vermuteten eine sekretorische Funktion des NSEs (Ciges et al. 1977). Bisher wurde angenommen, dass die Zellen im NSE nicht an der sensorischen Funktion des VNOs beteiligt sind und keine Rezeptoren enthalten (Breipohl et al. 1979). Einige Studien, die steroidbindende Globuline wie SHBG, DBP und CBG in einzelnen Zellen des NSEs von Ratten demonstrierten (Dolz et al. 2013, Ploss et al. 2014b, Rodewald et al. 2017a), zeigen damit, dass das NSE eine Funktion bei der Steroidbindung hat. SHBG spielt wahrscheinlich auch für die Aufnahme von

Steroidderivaten mit Pheromonfunktionen im VNO eine Rolle (Ploss et al. 2014b). Diese Ergebnisse deuten auf eine sensorische Funktion des NSEs hin – vermutlich handelt es sich bei diesen Zellen also um sekundäre Sinneszellen. Das OMP, welches in sensorisch aktiven Zellen exprimiert ist, wird womöglich in genau diesen Zellen des NSEs gebildet. Weitere immunhistochemische Färbungen sind nötig um zu klären, ob es sich hierbei um Kolokalisationen handelt.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen auf der basalen Seite einiger Epithelzellen des NSEs Axone, was die Idee der sekundären Sinneszellen stärkt. Die Informationen könnten so zum Gehirn weitergeleitet werden. In diesen speziellen Anschnitten konnte keine synaptische Verbindung gesehen werden, vielleicht bedingt durch die Lage des Semidünnschnittes. In einer meiner Studien konnte gezeigt werden, dass unter VDR- und DBP-positiven Zellen des NSEs diese Axone ebenfalls VDR-positiv sind, was auf einen funktionellen Zusammenhang bezüglich der Aufnahme und des Transports von Vitamin D hindeutet (siehe 4.2). Um welche Nerven es sich hier handelt, wurde in dieser Studie nicht untersucht. Es wird diskutiert, ob neben dem Vomeronasalnerv der N. terminalis als „nullter Hirnnerv“ im vomeronasalen System bzw. bei der Detektion von Pheromonen auch bei Säugetieren eine Rolle spielt (Demski und Northcutt 1983, Wirsig und Leonard 1987, Vilensky 2014) – dieser könnte auch zum NSE Fasern entsenden.

In den Geschmacksknospen der Zunge, die typische sekundäre Sinneszellen enthalten, wird der Signalmechanismus nach der Bindung des Liganden an einen membranständigen Rezeptor über die G-Protein-Untereinheit α -Gustducin vermittelt. Exemplarisch wurde das NSE der Ratte auf α -Gustducin getestet, aber keine spezifische Färbung gesehen. Wenn es sich um sekundäre Sinneszellen handelt, müssen die Mechanismen auf anderer Grundlage ablaufen. Diese Frage und ob es alters- und geschlechtsabhängige Unterschiede in der Verteilung und im Auftreten OMP-positiver Zellen im VNO gibt, muss in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden.

6.2 Das Vomeronasalorgan als Zielort für Steroidhormone

Das VNO dient primär der Pheromondetektion. Darunter fallen z. T. volatile und insbesondere nicht-volatile steroidale Pheromone, die nur über direkten Kontakt und mit Hilfe des Pumpmechanismus aufgenommen werden können. So werden z. B. Androgen- und Östrogen-derivate in gebundener Form über den vomeronasalen Gang zu den sensorischen Zellen des VNOs transportiert und nach gängiger Meinung am SE aufgenommen.

Die molekularen Mechanismen der schnellen membranassoziierten Antwort auf Steroide sind immer noch nicht vollständig geklärt. Es ist bekannt, dass insbesondere Sexualsteroiden über das VNO wahrgenommen werden und schnelle Verhaltensänderungen auslösen können, die bereits in Sekunden oder maximal Minuten auftreten. Die klassische genomische Antwort über den Kernrezeptor dauert hierfür zu lang, sodass ein zweiter, schneller Weg der Signalvermittlung existieren muss.

Calciferol als aktives Vitamin D-Derivat wirkt außerdem als Neurosteroid. Einige Arbeitsgruppen konnten VDR bzw. DBP im Zentralnervensystem von Wirbeltieren inklusive dem Menschen nachweisen, besonders im limbischen System, beispielsweise der Amygdala und dem Hippocampus (Prufer und Jirikowski 1997, Prufer et al. 1999, Kalueff und Tuohimaa 2007, Jirikowski et al. 2009). Auch die Stria terminalis konnte als Vitamin D-Target identifiziert werden (Stumpf et al. 1982). Calcitriol hat zum einen neuroprotektive Funktionen, zum anderen ist es an kognitiven Funktionen und der Entwicklung des Gehirns und der Neuronen beteiligt (Harms et al. 2011, Soni et al. 2012). Das Auftreten von VDR und DBP in den verschiedenen Gehirnarealen legt die Funktion von Vitamin D als Neurosteroid nahe. Die Funktionen im limbischen System gehen wahrscheinlich aber über rein neuroprotektive oder entwicklungsbezogene hinaus. Besonders in dieser, für das Verhalten wichtigen Region des Gehirns, kann Vitamin D direkt Einfluss auf Emotionen, Sozial-, Territorial- und Sexualverhalten nehmen. Die Stria terminalis wird beispielsweise bei Stress oder Sexualverhalten aktiviert. Das Vorkommen von Vitamin D-Derivaten in der Stria terminalis deutet darauf hin, dass Vitamin D-Derivate in das limbische System gelangen können. Diese werden vermutlich auch über das olfaktorische System transportiert. Damit könnten Vitamin D-Derivate, die über das VNO teilweise aufgenommen werden, Einfluss auf das Verhalten nehmen.

Es ist bereits bekannt, dass nicht nur die V1R für die Steroidwahrnehmung im SE verantwortlich sind. So wurde gezeigt, dass der Östrogenrezeptor $ER\alpha$ in den Neuronen des SEs vorkommt (Cherian et al. 2014). Auch verschiedene Bindungsglobuline für Sexual- und Corticosteroide wie SHBG und CBG konnten im VNO der Ratte in beiden Epithelien nachgewiesen werden (Dolz et al. 2013, Ploss et al. 2014b).

Die Kernfrage meiner Arbeit beschäftigt sich mit der möglichen Aufnahme von Vitamin D über das VNO. Die meisten Derivate des Vitamin Ds liegen als Secosteroid vor. In verhaltensbiologischen Tests mit *Iberolacerta monticola*, der iberischen Gebirgseidechse,

konnte bereits eine Pheromon-Funktion für Provitamin D nachgewiesen werden (Martin und Lopez 2006).

Echsen nehmen über die Züngelbewegung und direkten Kontakt Pheromone, die besonders über die Femoraldrüsen der Männchen ausgeschieden werden, wahr und transportieren so nicht-volatile Substanzen zum VNO. Nach der Supplementation mit speziellen Vitaminpräparaten für Reptilien, die auch Vitamin D-Derivate enthalten, schieden die männlichen Tiere vermehrt Provitamin D über die Femoraldrüsen aus. Weibchen reagierten auf Sekretproben dieser Tiere im Vergleich zu Männchen, die nicht supplementiert wurden und weniger Provitamin D ausschieden, mit einer gesteigerten Frequenz von Züngelbewegungen. Immunhistochemisch konnte ich in meiner Arbeit VDR und DBP im VNO der adulten Ratte nachweisen (Rodewald et al. 2017a). Die funktionelle Bedeutung dieser Moleküle muss in physiologischen Studien weiter geklärt werden. Dennoch kann bereits auf morphologischer Basis vermutet werden, dass Vitamin D-Derivate auch bei Säugetieren über das VNO wahrnehmbar sind. In diesem Kontext könnte auch Vitamin D ähnlich wie bei Echsen auch bei Säugetieren Funktionen als Pheromon übernehmen. Dabei ist es vorstellbar, dass Vitamin D-Derivate auch bei Säugern erst zusammen mit Sexualsteroiden diese Funktion entfaltet.

6.3 Mögliche Antwortmechanismen auf Vitamin D-Derivate

VDR tritt kolokalisiert mit DBP im VNO in den Neuronen des SEs und in einigen Zellen des NSEs auf. Die RT-PCR bestätigte eine intrinsische Genexpression beider Proteine im VNO (Rodewald et al. 2017a). In den Neuronen des SEs tritt VDR zum einen im perinukleären Zytosol auf und teilweise im Nukleus, zum anderen membranassoziiert in den apikalen dendritischen Vorwölbungen und den Mikrovilli. DBP tritt meist in den Dendriten, Axonen und kolokalisiert mit VDR in den dendritischen Vorwölbungen auf. Die dendritischen Vorwölbungen konnten in elektronenmikroskopischen Aufnahmen im SE genauer charakterisiert werden (Hofer et al. 2000, Rodewald et al. 2017a) und sind den Bulbi dendritici der olfaktorischen Sinneszellen im olfaktorischen Epithel sehr ähnlich. An den Bulbi dendritici befinden sich die Mikrovilli, die im Wesentlichen der Aufnahme olfaktorischer Stimuli dienen. In diesem Falle befinden sich auch innerhalb der Vorwölbung DBP und VDR, was dafür spricht, dass diese ebenfalls an der Aufnahme von Vitamin D-Derivaten beteiligt sind. Auch in den vomeronasalen Drüsen wurde DBP in den Granula der sekretorischen Zellen nachgewiesen, aber nicht der VDR. Die Drüsen sezernieren das DBP in den vomeronasalen Gang des VNOs, wo es Vitamin D-Derivate

außerhalb der Zellen in unterschiedlichen Affinitäten binden und stabilisieren kann. Über das DBP im Lumen können die Vitamin D-Derivate zu den Zellen des VNOs, an deren apikaler Seite sowohl im SE als auch im NSE ein membranassoziierter VDR vorkommt, transportiert werden.

Das membranassozierte Auftreten von VDR legt nahe, dass dieser Rezeptor nicht nur den klassischen Weg beschreitet: Über diesen würden Vitamin D-Derivate, die durch die Membran diffundieren, an VDR binden und anschließend die genomische Antwort auslösen. Die besondere Lokalisation des Rezeptors an der Membran der dendritischen Vorwölbungen und den Mikrovilli deutet auf die Beteiligung an einer schnellen Antwort an der Membran hin. Daher wird in dieser Studie zwischen dem membranassozierten VDR (VDR_m) und dem klassischen, nukleären VDR (VDR_n) unterschieden. Da der Antikörper, der für die immunhistochemischen Färbungen genutzt wurde, für VDR hochspezifisch ist, kann davon ausgegangen werden, dass beide Rezeptoren strukturell sehr ähnlich sind. Ob es sich hier aber wie bei den Östrogenrezeptoren (Li et al. 2003) um Splicingvarianten handelt, ist bisher nicht untersucht worden. Auch in anderen Geweben wurde bereits ein membranständiger VDR gefunden. Beispielsweise findet die schnelle nicht-genomische Antwort auf Calcitriol im Dünndarm über den caveolenassozierten VDR_m statt (Huhtakangas et al. 2004, Norman 2006).

Der klassische Kernrezeptor VDR, der zur Familie der Steroidrezeptoren Typ II zählt, kann offenbar nicht mehr zu den reinen Kernrezeptoren gezählt werden. Auf Grund der Existenz eines VDR_m im VNO stellt sich nun die Frage, wie die Mechanismen an der Membran ablaufen könnten und wo genau sich der VDR_m befindet. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, wie die nicht-genomische und schnelle Antwort auf Vitamin D-Derivate (und äquivalent dazu auch auf andere Steroide) an der Membran ablaufen kann (Abb. 11). Der VDR_m kann entweder extra- oder intrazellulär an der Membran gebunden vorkommen oder nicht an der Membran gebunden, aber membranah auftreten. Ein VDR_m mit einer extrazellulären Ligandenbindungsstelle könnte eine schnelle Antwort auslösen, ohne dass das Vitamin D-Derivat in die Zelle aufgenommen werden muss (Abb. 11, II).

Ein kleiner Teil der Steroide wird vermutlich auch im Lumen ungebunden auftreten. Freie Steroide können auf Grund ihrer lipophilen Eigenschaften durch Membranen diffundieren. Vermutlich diffundieren sie zunächst in den lipophilen inneren Abschnitt der Membran und können prinzipiell mit der gleichen Wahrscheinlichkeit in die Zelle oder wieder nach außen transportiert werden. Wenn sich nun aber intrazellulär in den dendritischen

Vorwölbungen bzw. den Mikrovilli ein an der Membran gebundener (Abb. 11, III) oder membrannaher VDRm (Abb. 11, IV) befindet, wird das Vitamin D-Derivat durch die hohe Affinität zu dem Rezeptor eher in das Zellinnere transportiert. Diesen Effekt könnte das DBP im Zellinneren unterstützen. Gebunden am intrazellulären VDRm könnte so ebenfalls eine schnelle nicht-genomische Antwort ausgelöst werden. Außerdem können Vitamin D-Derivate nach der Aufnahme direkt an DBP gebunden und über die Dendriten weiter transportiert werden (Abb. 11, I), z. B. zu den Perikarya. Die Bindeproteine könnten hier ebenfalls eine Pufferfunktion übernehmen und die Steroide für eine gewisse Zeit speichern. Wenn das Vitamin D-Derivat anschließend an einen VDRn gebunden wird, kann nach einer Dimerisierung der Rezeptor-Liganden-Komplexe im Zellkern die genomische Antwort ausgelöst werden.

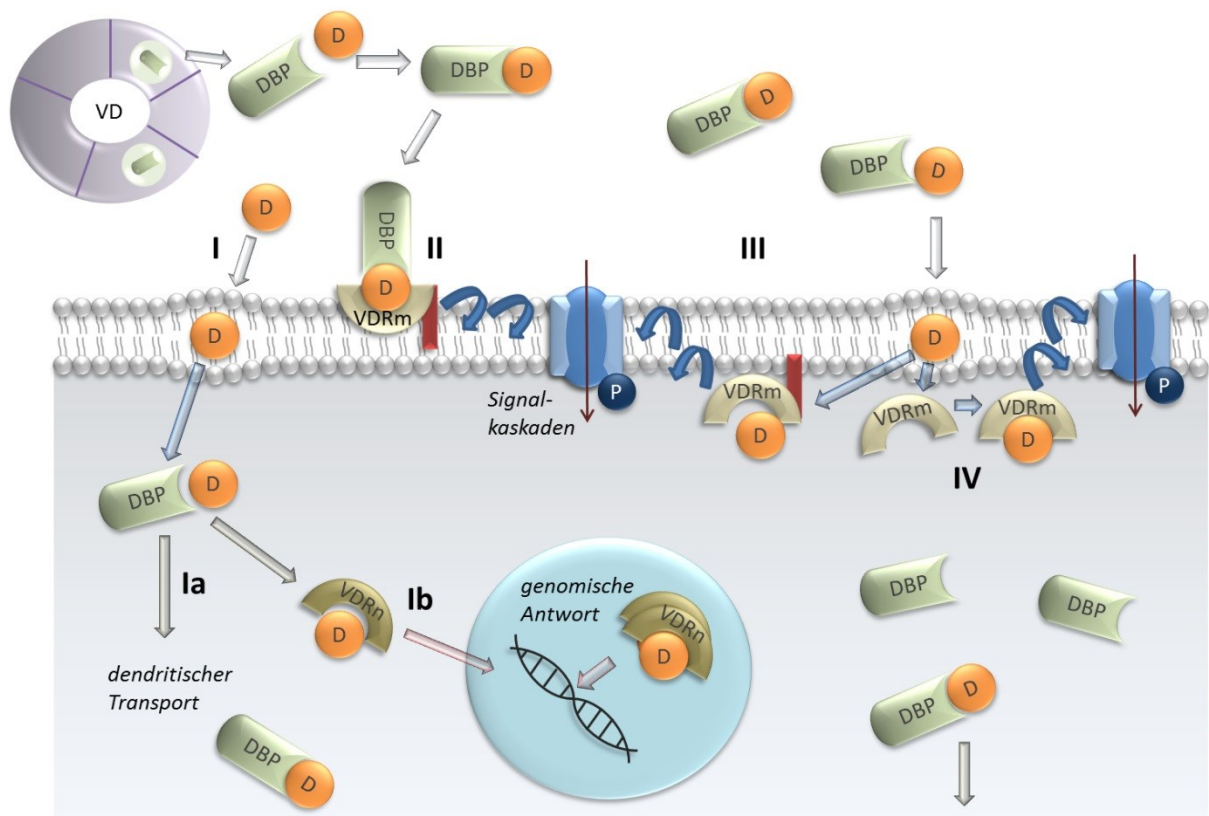


Abb. 11: Hypothetische Varianten der molekularen Antwortmechanismen auf Vitamin D-Derivate: I. Einige wenige Moleküle diffundieren frei durch die Membran. Diese können entweder an DBP gebunden und darüber transportiert werden (Ia), oder sie binden an VDRn und lösen nach einer Dimerisierung eine genomische Antwort im Nukleus aus (Ib). II. DBP aus den Drüsen bindet Vitamin D-Derivate im Lumen. Dieser Komplex bindet extrazellulär an einen VDRm und löst direkt eine schnelle nicht-genomische Antwort aus. III. Ein intrazellulärer VDRm bindet nach der Aufnahme das Derivat und löst eine nicht-genomische Antwort aus. IV. Ein intrazellulärer freier VDRm, der sich membrannah aufhält, nimmt freihindurchdiffundierende Derivate auf und löst vor Ort an der Membran eine nicht-genomische Antwort aus. (verändert nach Rodewald et al. 2017b)

Bereits andere Autoren beobachteten Membranrezeptoren für Steroide (Schumacher 1990, Thomas 2012): Der G-Protein-gekoppelte GPR30 für Östrogene (Cherian et al. 2014), eine Variante des Östrogenrezeptors ER α (Li et al. 2003), Androgenrezeptoren (Lutz et al. 2003) und der Progestagenrezeptor mPR (Thomas 2012) wurden bei verschiedenen Spezies an der Membran gefunden. Die schnellen Antwortmechanismen könnten z. B. an G-Proteine gekoppelt sein, die enzymatisch die Konzentration von second messengern erhöhen, die wiederum Proteinkinasen aktivieren und eine Phosphorylierung und Öffnung von Ionenkanälen bewirken.

Die Mechanismen der membranständigen Steroidrezeptoren im VNO müssen noch genauer untersucht werden. Sicher ist nach diesen Untersuchungen, dass die schnellen Mechanismen im SE an den dendritischen Vorwölbungen unter Beteiligung der Mikrovilli ablaufen und ein VDRm in dieser Region existiert.

In einigen Zellen wurde OMP kolokalisiert mit DBP beobachtet (Rodewald et al. 2016, Rodewald et al. 2017a). Vermutlich handelt es sich um dieselben Zellen, die auch VDR-positiv waren. In früheren Studien wurde auch SHBG (Ploss et al. 2014b) und CBG (Dolz et al. 2013) in einigen Zellen des NSEs nachgewiesen. Das Auftreten der Steroid-Bindungsglobuline könnte die diskutierte sekretorische Funktion des NSEs erklären. So würden die Bindeglobuline in das Lumen sezerniert werden. Das Auftreten des VDRs im NSE deutet darüber hinaus darauf hin, dass das NSE auch an der Aufnahme von Steroiden beteiligt sein kann. Außerdem ist das Auftreten von OMP, welches besonders in olfaktorischen Sinneszellen vorkommt, ein Hinweis, dass es sich bei diesen Zellen um sekundäre Sinneszellen handelt. Einige dieser Zellen im NSE besitzen zudem Eigenschaften typischer sekundärer Sinneszellen – sie tragen z. T. apikale Mikrovilli und haben auf der basalen Seite eine Verbindung zu Neuronen. Das VDR kommt im NSE besonders an den Mikrovilli bzw. Zilien vor, aber auch auf der basalen Seite in den Axonen direkt unter den VDR- und DBP-positiven Zellen. Die Kolokalisation mit DBP ist im Zytosol beobachtbar. Möglicherweise handelt es sich bei dem apikalen VDR ebenfalls um VDRm und bei dem zytosolischen um VDRn. Das zytosolische DBP könnte Vitamin D-Derivate zu den Axonen transportieren, wo es anschließend aufgenommen und als Neurosteroid zum limbischen System weiter transportiert werden könnte.

Ein geschlechtsspezifischer Unterschied wurde nicht beobachtet. Welche Steroidderivate bei der Aufnahme im VNO eine Rolle spielen, soll in weiteren Verhaltenstests geklärt werden. Meine morphologischen Untersuchungen bestätigen die große Bedeutung von

Steroid-Bindeglobulinen und -Rezeptoren im VNO. So spielen nicht nur Sexualsteroiden eine Rolle im VNO, sondern auch Vitamin D-Derivate.

6.4 Die verhaltensbiologische Bedeutung von Vitamin D bei Säugetieren

Auf der Basis meiner Veröffentlichungen über die Verteilung von OMP, DBP und VDR im VNO der Ratte und der Studie über die verhaltensbiologische Bedeutung von Vitamin D bei der iberischen Gebirgseidechse, stellt sich die Frage, ob einige Vitamin D-Derivate auch bei Säugetieren eine verhaltensbiologische Bedeutung haben. Bei der Detektion steroidaler Pheromone übernimmt vermutlich nicht nur das SE, sondern auch das NSE Funktionen. Martin und Lopez argumentieren in ihrer Studie (Martin und Lopez 2006), dass Calcitriol die Mobilisierung der T-Zellen und die Bildung und Reifung von Makrophagen anregt und damit eine wichtige Funktion im Immunsystem hat (de Abreu et al. 2009, Baeke et al. 2010, Kamen und Tangpricha 2010). Damit signalisiert es, wenn es zur intraspezifischen Kommunikation genutzt wird, dem anderen Individuum ein gutes Immunsystem und damit eine gute Gesundheit, was den Wert als Fortpflanzungspartner steigert.

Nach meinen morphologischen Studien führte ich olfaktorische Tests mit Hunden und Wölfen durch. Die ersten Tests mit Hunden orientierten sich an dem Versuchsaufbau von Concha et al. (Concha et al. 2014). Den Hunden (n = 6) (Tab. 4) wurden in zufälliger Reihenfolge vier Konzentrationen von Cholecalciferol zwischen 1:1.000 ($2,6 \times 10^{-3}$ mol/l) und 1:1 Mio ($2,6 \times 10^{-6}$ mol/l), gelöst in leichtem Mineralöl angeboten.

Tab. 4: Auflistung der Versuchstiere, die an den olfaktorischen Tests mit Cholecalciferol in Lincoln, UK, teilnahmen.

Rasse	Geschlecht	Geburtsdatum/-jahr	Fortpflanzungsfähigkeit	Testzeitraum
<i>Canis lupus familiaris</i>				
Jack Russel Terrier	Männchen	08.06.2012	Kastration (März 2016)	Oktober 2016
Jack Russel Terrier	Männchen	29.10.2009	Kastration	Oktober 2016
Border Terrier	Männchen	Anfang 2012	Kastration	Oktober 2016
Labrador	Männchen	29.12.2005	Kastration	Oktober 2016
Boxer-Labrador-Mix	Weibchen	2005	Kastration	Oktober 2016
Malinois	Weibchen	August 2009	Kastration	Oktober 2016

Dabei wurde jede Konzentration mit einer Kontrolle (die nur aus dem Mineralöl bestand) gepaart. Zwischen den Durchgängen wurden Pausen gemacht, um Kreuz- und Kurzzeithabituation zu vermeiden (Rodewald et al. 2017b). Der Versuchsaufbau zielt zunächst darauf ab, zu klären, ob Vitamin D-Derivate, speziell Cholecalciferol, für Säugetiere überhaupt wahrnehmbar sind.

Es konnte beobachtet werden, dass Hunde in den meisten Fällen längere Zeit an den Cholecalciferolproben rochen als an den Kontrollen. Dabei stieg die Riechdauer mit sinkender Konzentration an. Diese Beobachtungen beziehen sich allerdings nur auf adulte Tiere, die noch nicht das Alter von 10 Jahren erreicht bzw. überschritten hatten. Bei älteren Hunden unterschieden sich die Riechzeiten an den Cholecalciferolproben nicht von denen an den Kontrollen (unabhängig von der Konzentration). Wahrscheinlich nehmen ältere Hunde das Cholecalciferol nasal nicht mehr in derselben Weise wie jüngere Hunde wahr. So ist z. B. von Ratten bekannt, dass die Proliferationsrate des VNOs mit zunehmenden Alter sinkt (Weiler et al. 1999), damit sinkt auch die Funktionsfähigkeit. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Regenerationsfähigkeit des olfaktorischen Epithels bei Hunden ab 14 Jahren nachlässt (Hirai et al. 1996). Das Epithel erscheint atrophiert und die Anzahl der Sinneszellen ist deutlich kleiner als bei jüngeren Hunden. Die ältesten Hunde in diesem Versuch waren zum Versuchszeitpunkt zwischen 10 und 11 Jahre alt. Die Degeneration der Epithelien ist ein fortlaufender Prozess, der vermutlich bereits früher beginnt und abhängig von der generellen Lebenserwartung der jeweiligen Art bzw. Rasse ist. Es ist möglich, dass dieser Effekt auch in diesen Tests bei den älteren Hunden eine Rolle spielt und zu den generell geringen Riechzeiten an allen Proben führte. Bei einem der männlichen Hunde (10 Jahre) gab es keinen Unterschied zwischen den Riechzeiten an den Kontrollen und den Cholecalciferolproben. Habituationen sind als Erklärung dieses Effekts unwahrscheinlich, da es zwischen den einzelnen Tests Pausen gab, um eine Gewöhnung zu verhindern. Außerdem konnte diese Reaktion bei den anderen Hunden so nicht beobachtet werden. Vermutlich ist die verminderte Regenerationsfähigkeit ursächlich dafür, dass die Bedeutung von Sexualpheromonen mit steigendem Alter nachlässt.

Grundsätzlich wurde an den Cholecalciferolproben kein Flehmen beobachtet. Flehmen kann bei allgemeiner Erregung oder nach der Aufnahme von Gerüchen, die u. a. als Pheromone wirken können (z. B. über Urinproben oder direkten Kontakt zur Genitalregion anderer Individuen), ausgelöst werden und spielt eine Rolle beim Sexualverhalten (Ladewig et al. 1980, Hart und Leedy 1987). Vermutlich hat Vitamin D generell erst im

Kontext mit anderen Pheromonen eine Bedeutung für die chemische Kommunikation und löste in diesen Versuchen daher kein Flehmen aus.

In weiteren Versuchen testete ich unterschiedliche Konzentrationen des Provitamins D an Hunden verschiedener Rassen und Timberwölfen (*Canis lupus lycaon*). Bei den Tests mit den Hunden hielt sich eine beobachtende Person im selben Versuchsraum auf. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Person ungewollt Einfluss auf den Versuch nahm. An diesem Versuch nahmen unterschiedliche Rassen teil. Eventuell gibt es rassenspezifische Unterschiede bei der Wahrnehmung von Steroiden. So ist es möglich, dass bei Hunden mit brachycephalen Kopfformen das olfaktorische System bzw. das VNO nicht vergleichbar funktioniert oder ausgebildet ist, wie bei Hunden mit der ursprünglichen langnasigen Kopfform. Einer neueren Studie zufolge sind Hunde mit brachycephaler Kopfform wie der Mops in der Lage, Gerüche genauso gut oder teilweise sogar besser zu differenzieren wie Hunde mit langnasiger Kopfform (Hall et al. 2015). Eine andere aktuelle Studie publizierte Gegenteiliges – die kurznasigen Kopfformen hätten einen negativen Einfluss auf die Riechfähigkeit (Polgar et al. 2016). Solche Defizite könnten auch das VNO betreffen. Daher wurden weitere Tests mit Timberwölfen durchgeführt, um rassenspezifische Unterschiede auszuschließen. Während der Versuche mit den Wölfen hielt sich keine Person im Testraum auf.

Die Unterschiede zwischen den Riechzeiten an den Provitamin D-Proben und an den Ethanolkontrollen sind in dieser Vorstudie nicht signifikant, jedoch konnten insgesamt Tendenzen beobachtet werden. An den Provitamin D-Konzentrationen 1:1.000 und 1:100.000 konnten bei den Wolfsmännchen längere Riechzeiten im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden als bei den Wolfswelbchen. Wolfswelbchen hingegen zeigen längere Riechzeiten an der Konzentration 1:1.000 und an 1:10.000. Wohingegen die Hündinnen deutlich länger an der Provitamin D-Konzentration 1:100.000 rochen. Rüden zeigen deutlich längere Riechzeiten an der geringsten Konzentration von 1:1Mio. Bei den Wölfen wird Provitamin D in hohen und sehr niedrigen Konzentrationen von den Männchen wahrgenommen. Die Rüden zeigten bei der geringsten Konzentration ebenfalls deutlich höhere Riechdauern, ähnlich wie bei den Versuchen mit Cholecalciferol. Zukünftige Untersuchungen sollen klären, ob tatsächlich eher von den Welbchen auch Vitamin D ausgeschieden wird – denn die Ergebnisse der Vorstudie deuten darauf hin, dass besonders die Männchen an den geringsten Provitamin D-Proben riechen. Martin und Lopez (Martin und Lopez 2006) zeigten ebenfalls, dass iberische Gebirgseidechsen in der

Lage sind, sehr geringe Konzentrationen zu detektieren, wobei in diesem Fall die Weibchen den erhöhten Vitamin D-Gehalt der Sekrete der Männchen detektierten. In meinen Vortests konnte ich zeigen, dass womöglich auch Säugetiere, hier aber insbesondere die Männchen dazu in der Lage sind.

Grundsätzlich werden Pheromone beispielsweise über Urin oder Sekrete von Geschlechtsdrüsen in sehr geringen Konzentrationen ausgeschieden. Daher sind besonders die geringsten Konzentrationen auch biologisch relevanter. Falls Vitamin D-Derivate bei der sozialen Kommunikation eine Rolle spielen, ist es auch in diesem Fall nahe liegend, dass besonders die kleinsten Konzentrationen für das Tier interessant sind.

Die Männchen beider Arten hatten in den meisten Fällen ihren ersten Kontakt an den Provitamin D-behandelten Holzblöcken und nicht an den Kontrollblöcken: die Wolfsmännchen in 69,2 % der Fälle (im Vergleich dazu nur bei 44,4 % der Wolfswelbchen) und die Rüden in 72,7 % der Fälle (die Hündinnen nur in 12,5 %). Möglicherweise wurde das Provitamin D von den männlichen Tieren bereits vor direktem Kontakt wahrgenommen. Dies führte möglicherweise dann zum direkten Kontakt mit den mit Provitamin D behandelten Blöcken. Vitamin D als lipophile Substanz ist nur schwach volatil (Heudi et al. 2004), daher werden vermutlich nur geringste Konzentrationen aerosolisch wahrgenommen, bevor der direkte Kontakt zum Holzblock besteht. Meine morphologischen Ergebnisse zeigen, dass die vomeronasalen Drüsen DBP-haltig sind – durch die Ausschüttung von DBP in das vomeronasale Lumen könnten einige der Vitamin D-Derivate vermutlich auch ohne direkten Kontakt zur Probe aufgenommen, stabilisiert und zu den Sinneszellen des VNOs transportiert werden.

Ob die Tiere den Geruch von Provitamin D interessanter finden, kann nicht allein aus den Riechzeiten ermittelt werden. Flehmen, oder vermehrtes Speicheln oder Lecken wurde auch hier nicht deutlich gezeigt. Dennoch konnte in den ersten Vorstudien die Tendenz beobachtet werden, dass Vitamin D-Derivate über das olfaktorische System wahrgenommen werden können. Außerdem konnte ich zeigen, dass die Männchen beider Arten in der Lage sind, geringste Konzentrationen von Provitamin D bzw. Cholecalciferol wahrzunehmen. In der Provitamin D-Studie suchten die Männchen beider Arten in den meisten Fällen zuerst die Provitamin D-Proben auf – die Wahrnehmung könnte bereits vor direkten Kontakt stattfinden. Trotz der geringen Volatilität reichen vermutlich geringste Spuren für die Wahrnehmung aus. Eine weiterführende Studie könnte Aufschluss darüber geben, ob es signifikante geschlechtsabhängige Unterschiede in der Vitamin D-

Wahrnehmung gibt, ob verschiedene Vitamin D-Derivate unterschiedliche Verhaltensreaktionen auslösen und wie Vitamin D im Kontext mit anderen Steroiden auf das Verhalten von Säugetieren wirkt.

7 Schlussfolgerungen

In dieser interdisziplinären Arbeit wurde zum einen morphologisch untersucht, ob und wo genau im Vomeronasalorgan von Ratten und Mäusen der Vitamin D-Rezeptor und das Vitamin D-bindende Protein lokalisiert sind und zum anderen verhaltensbiologisch getestet, ob Vitamin D-Derivate olfaktorisch wahrgenommen werden können. In einer weiteren Studie beschäftigte ich mich damit, wo genau im Vomeronasalorgan das olfaktorische Markerprotein exprimiert wird. In dieser Arbeit konnten wesentliche Erkenntnisse gewonnen werden: 1. Das nicht-sensorische Epithel des Vomeronasalorgans ist positiv für das olfaktorische Markerprotein und besitzt möglicherweise sensorische Funktionen. 2. Das Vomeronasalorgan ist ein Vitamin D-Zielorgan. 3. Im Vomeronasalorgan existiert ein membranassoziierter Vitamin D-Rezeptor. 4. Säugetiere können wahrscheinlich Vitamin D olfaktorisch wahrnehmen.

Das nicht-sensorische Epithel hat nach bisherigen Angaben keine spezifischen Funktionen. Meine immunhistochemischen Untersuchungen zeigten das Vorkommen des olfaktorischen Markerproteins nicht nur im sensorischen Epithel, sondern auch im nicht-sensorischen Epithel des Vomeronasalorgans. Außerdem demonstrierte ich im nicht-sensorischen Epithel das Vorkommen des Vitamin D-bindenden Proteins und des Vitamin D-Rezeptors. Unterhalb einiger Zellen befinden sich zudem Axone. In vorherigen Studien anderer Autoren konnten bereits andere Steroidbindepoteine im nicht-sensorischen Epithel nachgewiesen werden. Diese und ebenso meine Ergebnisse weisen darauf hin, dass auch das nicht-sensorische Epithel, im Gegensatz zu dem bisher Angenommenen, ebenfalls an der Detektion von Molekülen, insbesondere von Steroiden, beteiligt ist.

Über immunhistochemische Untersuchungen konnten das Vitamin D-bindende Protein und der Vitamin D-Rezeptor im Vomeronasalorgan von Ratten und Mäusen in beiden Epithelien lokalisiert werden. Sowohl der Vitamin D-Rezeptor als auch das Vitamin D-bindende Protein werden außerdem im Vomeronasalorgan der Ratte intrinsisch exprimiert. Es können zwei Typen des Vitamin D-Rezeptors unterschieden werden: der bereits beschriebene klassische Vitamin D-Rezeptor und ein membranassoziierter Vitamin D-Rezeptor. Aus meinen Ergebnissen konnte ich ein Schema der möglichen molekularen Wirkungsmechanismen am Vomeronasalorgan entwickeln. Der membranassoziierte Vitamin D-Rezeptor befindet sich an den dendritischen Vorwölbungen und Mikrovilli der Neurone des sensorischen Epithels und den Zilien einzelner Zellen im nicht-sensorischen Epithel.

Daher spielt er vermutlich eine Rolle bei einer schnellen nicht-genomischen Antwort auf Vitamin D. Die genomische Antwort im Kern wird über den klassischen Vitamin D-Rezeptor vermittelt. Das Vitamin D-bindende Protein wird dabei nicht nur im nicht-sensorischen und sensorischen Epithel exprimiert, sondern auch in den vomeronasalen Drüsen. Von hier kann es in das Lumen sezerniert werden, wo es die lipophilen Vitamin D-Derivate bindet und sie in dem hydrophilen Milieu stabilisiert und transportiert. Das Vitamin D-bindende Protein ist auf diese Weise vermutlich ebenfalls an der schnellen nicht-genomischen Verhaltensantwort auf Vitamin D beteiligt.

Die Ergebnisse sprechen dafür, dass Vitamin D-Derivate im Vomeronasalorgan wahrgenommen werden können. Bereits von anderen Autoren wurde eine Funktion als Pheromon bei Echsen vermutet. Meine Ergebnisse zeigten, dass bei den untersuchten Säugetierarten die morphologischen Grundlagen für die Detektion von Vitamin D über das Vomeronasalorgan gegeben sind. In meinen verhaltensbiologischen Tests konnte ich außerdem beobachten, dass Hunde und Wölfe Vitamin D-Derivate olfaktorisch wahrnehmen. Damit ist es möglich, dass Vitamin D-Derivate eine Rolle bei der chemischen Kommunikation spielen.

In zukünftigen verhaltensbiologischen Tests sollen verschiedene Vitamin D-Derivate auch gegenüber Geruchsstoffen und bekannten steroidal Pheromonen getestet werden. Weiterhin wird in einer Folgestudie getestet, ob in Drüsensekreten, Urinproben und auch menschlichen Schweißproben Vitamin D-Derivate ausgeschieden werden. Der Mensch besitzt zumindest ein vomeronasales Epithel (Garcia-Velasco und Mondragon 1991, Drenckhahn und Benninghoff 2004). So könnte Vitamin D an therapeutischer Bedeutung gewinnen. Ein Vitamin D-Mangel kann bei saisonalen Verstimmungen (Lansdowne und Provost 1998), z. T. auch bei Depressionen (Berk et al. 2007) und nach neueren Studien auch bei Stress generell (Al-Dujaili et al. 2016) eine Rolle spielen. Die nasale Applikation wäre ein effektiverer Ansatz, das Gehirn und besonders das limbische System unter Umgehung der Blut-Hirn-Schranke schnell zu erreichen.

8 Literaturverzeichnis

- Ahne WL, H.-G.; Stohrer, M.; Wolf, E. 2000. Zoologie. Stuttgart, Germany: Schattauer.
- Al-Dujaili EAS, Munir N, Iniesta RR. 2016. Effect of vitamin D supplementation on cardiovascular disease risk factors and exercise performance in healthy participants: a randomized placebo-controlled preliminary study. *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism*, 7 (4):153-165.
- Armbrecht HJ, Hodam TL, Boltz MA, Partridge NC, Brown AJ, Kumar VB. 1998. Induction of the vitamin D 24-hydroxylase (CYP24) by 1,25-dihydroxyvitamin D3 is regulated by parathyroid hormone in UMR106 osteoblastic cells. *Endocrinology*, 139 (8):3375-3381.
- Baeke F, Takiishi T, Korf H, Gysemans C, Mathieu C. 2010. Vitamin D: modulator of the immune system. *Curr Opin Pharmacol*, 10 (4):482-496.
- Barber PC, Raisman G. 1974. An autoradiographic investigation of the projection of the vomeronasal organ to the accessory olfactory bulb in the mouse. *Brain Res*, 81 (1):21-30.
- Barrios AW, Sanchez-Quinteiro P, Salazar I. 2014a. Dog and mouse: toward a balanced view of the mammalian olfactory system. *Front Neuroanat*, 8:106.
- Barrios AW, Sanchez Quinteiro P, Salazar I. 2014b. The nasal cavity of the sheep and its olfactory sensory epithelium. *Microsc Res Tech*, 77 (12):1052-1059.
- Barrios AW, Nunez G, Sanchez Quinteiro P, Salazar I. 2014c. Anatomy, histochemistry, and immunohistochemistry of the olfactory subsystems in mice. *Front Neuroanat*, 8:63.
- Baulieu EE, Robel P. 1990. Neurosteroids: a new brain function? *J Steroid Biochem Mol Biol*, 37 (3):395-403.
- Baulieu EE, Robel P. 1996. Dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate as neuroactive neurosteroids. *J Endocrinol*, 150 Suppl:S221-239.
- Baulieu EE, Robel P, Schumacher M. 2001. Neurosteroids: beginning of the story. *Int Rev Neurobiol*, 46:1-32.
- Berglund H, Lindstrom P, Savic I. 2006. Brain response to putative pheromones in lesbian women. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (21):8269-8274.
- Berk M, Sanders KM, Pasco JA, Jacka FN, Williams LJ, Hayles AL, Dodd S. 2007. Vitamin D deficiency may play a role in depression. *Medical Hypotheses*, 69 (6):1316-1319.
- Bigiani A, Mucignat-Caretta C, Montani G, Tirindelli R. 2005. Pheromone reception in mammals. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 154:1-35.
- Bjornstrom L, Sjoberg M. 2005. Mechanisms of estrogen receptor signaling: Convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Molecular Endocrinology*, 19 (4):833-842.
- Bock P, Rohn K, Beineke A, Baumgartner W, Wewetzer K. 2009. Site-specific population dynamics and variable olfactory marker protein expression in the postnatal canine olfactory epithelium. *J Anat*, 215 (5):522-535.
- Böhme G. 2004. Lehrbuch der Anatomie der Haustiere Band 4: Nervensystem, Sinnesorgane, Endokrine Drüsen. Georg Thieme Verlag.
- Bolde C, Jirikowski G, Prufer K. 2017. Neuropeptide Y and 1, 25-dihydroxyvitamin D3 receptors colocalize in neurons of the rat cerebral cortex. *European Journal of Anatomy*, 4 (1):7-13.
- Bouillon R. 2011. The vitamin D binding protein DBP. *Vitamin D*, 1:57-72.

- Bouillon R, Suda T. 2014. Vitamin D: calcium and bone homeostasis during evolution. *BoneKey reports*, 3.
- Brechbuhl J, Klaey M, Broillet MC. 2008. Grueneberg ganglion cells mediate alarm pheromone detection in mice. *Science*, 321 (5892):1092-1095.
- Breipohl W, Bhatnagar KP, Mendoza A. 1979. Fine structure of the receptor-free epithelium in the vomeronasal organ of the rat. *Cell Tissue Res*, 200 (3):383-395.
- Brennan PA, Zufall F. 2006. Pheromonal communication in vertebrates. *Nature*, 444 (7117):308-315.
- Bruce HM. 1959. An exteroceptive block to pregnancy in the mouse. *Nature*, 184:105.
- Buiakova OI, Baker H, Scott JW, Farbman A, Kream R, Grillo M, Franzen L, Richman M, Davis LM, Abbondanzo S, Stewart CL, Margolis FL. 1996. Olfactory marker protein (OMP) gene deletion causes altered physiological activity of olfactory sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 (18):9858-9863.
- Butenandt A, Beckmann R, Hecker E. 1961. Über den sexuallockstoff des seidenspinners, i. der biologische test und die isolierung des reinen sexuallockstoffes bombykol. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, 324 (1):71-83.
- Caldwell JD, Jirikowski GF. 2013. An active role for steroid-binding globulins: an update. *Horm Metab Res*, 45 (7):477-484.
- Chambliss KL, Yuhanna IS, Anderson RG, Mendelsohn ME, Shaul PW. 2002. ER β has nongenomic action in caveolae. *Molecular endocrinology*, 16 (5):938-946.
- Cherian S, Lam YW, McDaniels I, Struziak M, Delay RJ. 2014. Estradiol Rapidly Modulates Odor Responses in Mouse Vomeronasal Sensory Neurons. *Neuroscience*, 269:43-58.
- Chun RF. 2012a. New perspectives on the vitamin D binding protein. *Cell biochemistry and function*, 30 (6):445-456.
- Chun RF. 2012b. New perspectives on the vitamin D binding protein. *Cell Biochem Funct*, 30 (6):445-456.
- Ciges M, Labella T, Gayoso M, Sanchez G. 1977. Ultrastructure of the organ of Jacobson and comparative study with olfactory mucosa. *Acta Otolaryngol*, 83 (1-2):47-58.
- Clee MD, Humphreys EM, Russell JA. 1975. The suppression of ovarian cyclical activity in groups of mice, and its dependence on ovarian hormones. *J Reprod Fertil*, 45 (2):395-398.
- Cocke R, Thiessen DD. 1986. Chemocommunication among Prey and Predator Species. *Animal Learning & Behavior*, 14 (1):90-92.
- Concha A, Mills DS, Feugier A, Zulch H, Guest C, Harris R, Pike TW. 2014. Using sniffing behavior to differentiate true negative from false negative responses in trained scent-detection dogs. *Chem Senses*, 39 (9):749-754.
- Cooke NE, David EV. 1985. Serum Vitamin-D-Binding Protein Is a 3rd Member of the Albumin and Alpha-Fetoprotein Gene Family. *Journal of Clinical Investigation*, 76 (6):2420-2424.
- Cooke NE, McLeod JF, Wang XK, Ray K. 1991. Vitamin D binding protein: genomic structure, functional domains, and mRNA expression in tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 40 (4-6):787-793.
- de Abreu DF, Eyles D, Feron F. 2009. Vitamin D, a neuro-immunomodulator: implications for neurodegenerative and autoimmune diseases. *Psychoneuroendocrinology*, 34:S265-S277.
- Demski LS, Northcutt RG. 1983. The terminal nerve: a new chemosensory system in vertebrates? *Science*, 220 (4595):435-437.
- Do Rego JL, Seong JY, Burel D, Leprince J, Vaudry D, Luu-The V, Tonon M-C, Tsutsui K, Pelletier G, Vaudry H. 2012. Regulation of neurosteroid biosynthesis by neurotransmitters and neuropeptides. *Frontiers in endocrinology*, 3.

- Dolz W, Eitner A, Caldwell JD, Jirikowski GF. 2013. Expression of corticosteroid binding globulin in the rat olfactory system. *Acta Histochem*, 115 (4):376-381.
- Dorries KM, Adkinsregan E, Halpern BP. 1995. Olfactory Sensitivity to the Pheromone, Androstenone, Is Sexually Dimorphic in the Pig. *Physiology & Behavior*, 57 (2):255-259.
- Doving KB, Trotier D. 1998. Structure and function of the vomeronasal organ. *J Exp Biol*, 201 (Pt 21):2913-2925.
- Drenckhahn D, Benninghoff A. 2004. Anatomie: Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen. Zellen-und Gewebelehre, Entwicklungsbiologie, Bewegungsapparat, Herz-Kreislauf-System, Immunsystem, Atem-und Verdauungsapparat Anatomie: Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen Urban & Schwarzenberg.
- Dulac C, Torello AT. 2003. Molecular detection of pheromone signals in mammals: From genes to behaviour. *Nature Reviews Neuroscience*, 4 (7):551-562.
- Dulac C, Wagner S. 2006. Genetic analysis of brain circuits underlying pheromone signaling. *Annu Rev Genet*, 40:449-467.
- Elgayar SA, Eltony SA, Othman MA. 2014. Morphology of non-sensory epithelium during post-natal development of the rabbit vomeronasal organ. *Anat Histol Embryol*, 43 (4):282-293.
- Eltony SA, Elgayar SA. 2011. Morphology of the non-sensory tissue components in rat aging vomeronasal organ. *Anat Histol Embryol*, 40 (4):263-277.
- Eyles DW, Smith S, Kinobe R, Hewison M, McGrath JJ. 2005. Distribution of the Vitamin D receptor and 1 alpha-hydroxylase in human brain. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 29 (1):21-30.
- Farbman AI, Margolis FL. 1980. Olfactory marker protein during ontogeny: immunohistochemical localization. *Dev Biol*, 74 (1):205-215.
- Ferrero DM, Liberles SD. 2010. The secret codes of mammalian scents. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2 (1):23-33.
- Fleischer J, Hass N, Schwarzenbacher K, Besser S, Breer H. 2006. A novel population of neuronal cells expressing the olfactory marker protein (OMP) in the anterior/dorsal region of the nasal cavity. *Histochem Cell Biol*, 125 (4):337-349.
- Foradori CD, Weiser MJ, Handa RJ. 2008. Non-genomic actions of androgens. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 29 (2):169-181.
- Francia S, Pifferi S, Menini A, Tirindelli R. 2014. 10 Vomeronasal Receptors and Signal Transduction in the Vomeronasal Organ of Mammals. *Neurobiology of chemical communication*:297.
- Garcia-Velasco J, Mondragon M. 1991. The incidence of the vomeronasal organ in 1000 human subjects and its possible clinical significance. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 39 (4B):561-563.
- Garcion E, Wion-Barbot N, Montero-Menei CN, Berger F, Wion D. 2002. New clues about vitamin D functions in the nervous system. *Trends Endocrinol Metab*, 13 (3):100-105.
- Graziadei GA, Stanley RS, Graziadei PP. 1980. The olfactory marker protein in the olfactory system of the mouse during development. *Neuroscience*, 5 (7):1239-1252.
- Hall NJ, Glenn K, Smith DW, Wynne CD. 2015. Performance of Pugs, German Shepherds, and Greyhounds (*Canis lupus familiaris*) on an odor-discrimination task. *J Comp Psychol*, 129 (3):237-246.
- Harms LR, Burne THJ, Eyles DW, McGrath JJ. 2011. Vitamin D and the brain. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 25 (4):657-669.
- Hart BL, Leedy MG. 1987. Stimulus and hormonal determinants of flehmen behavior in cats. *Horm Behav*, 21 (1):44-52.

- Haussler MR, Jurutka PW, Mizwicki M, Norman AW. 2011. Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1 α ,25(OH)₂vitamin D₃: genomic and non-genomic mechanisms. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 25 (4):543-559.
- Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, Hsieh JC, Thompson PD, Selznick SH, Dominguez CE, Jurutka PW. 1998. The nuclear vitamin D receptor: Biological and molecular regulatory properties revealed. *Journal of Bone and Mineral Research*, 13 (3):325-349.
- Heudi O, Trisconi MJ, Blake CJ. 2004. Simultaneous quantification of vitamins A, D₃ and E in fortified infant formulae by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1022 (1-2):115-123.
- Higgins JJ. 2003. Introduction to modern nonparametric statistics.
- Hii CS, Ferrante A. 2016. The non-genomic actions of vitamin D. *Nutrients*, 8 (3):135.
- Hirai T, Kojima S, Shimada A, Umemura T, Sakai M, Itakura C. 1996. Age-related changes in the olfactory system of dogs. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 22 (6):531-539.
- Hofer D, Shin DW, Drenckhahn D. 2000. Identification of cytoskeletal markers for the different microvilli and cell types of the rat vomeronasal sensory epithelium. *J Neurocytol*, 29 (3):147-156.
- Huhtakangas JA, Olivera CJ, Bishop JE, Zanello LP, Norman AW. 2004. The vitamin D receptor is present in caveolae-enriched plasma membranes and binds 1 α ,25(OH)₂-vitamin D₃ in vivo and in vitro. *Mol Endocrinol*, 18 (11):2660-2671.
- Jacobson L, Trotier D, Doving KB. 1998. Anatomical description of a new organ in the nose of domesticated animals by Ludvig Jacobson (1813). *Chem Senses*, 23 (6):743-754.
- Jirikowski G, Kauntzer U, Dief A, Caldwell J. 2009. Distribution of vitamin D binding protein expressing neurons in the rat hypothalamus. *Histochemistry and Cell Biology*, 131 (3):365-370.
- Jones G, Strugnell SA, DeLuca HF. 1998. Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiological Reviews*, 78 (4):1193-1231.
- Kajikawa M, Ishida H, Fujimoto S, Mukai E, Nishimura M, Fujita J, Tsuura Y, Okamoto Y, Norman AW, Seino Y. 1999. An insulinotropic effect of vitamin D analog with increasing intracellular Ca²⁺ concentration in pancreatic beta-cells through nongenomic signal transduction. *Endocrinology*, 140 (10):4706-4712.
- Kalueff AV, Tuohimaa P. 2007. Neurosteroid hormone vitamin D and its utility in clinical nutrition. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 10 (1):12-19.
- Kamen DL, Tangpricha V. 2010. Vitamin D and molecular actions on the immune system: modulation of innate and autoimmunity. *Journal of Molecular Medicine*, 88 (5):441-450.
- Kang N, Kim H, Jae Y, Lee N, Ku CR, Margolis F, Lee EJ, Bahk YY, Kim MS, Koo J. 2015. Olfactory marker protein expression is an indicator of olfactory receptor-associated events in non-olfactory tissues. *PLoS One*, 10 (1):e0116097.
- Karlson P, Luscher M. 1959. Pheromones: a new term for a class of biologically active substances. *Nature*, 183 (4653):55-56.
- Keller-Costa T, Hubbard PC, Paetz C, Nakamura Y, da Silva JP, Rato A, Barata EN, Schneider B, Canario AV. 2014. Identity of a tilapia pheromone released by dominant males that primes females for reproduction. *Curr Biol*, 24 (18):2130-2135.
- Keverne EB. 1999. The vomeronasal organ. *Science*, 286 (5440):716-720.
- Kiraly SJ, Kiraly MA, Hawe RD, Makhani N. 2006. Vitamin D as a neuroactive substance: review. *ScientificWorldJournal*, 6:125-139.

- Kratzing JE. 1971. The fine structure of the sensory epithelium of the vomeronasal organ in suckling rats. *Aust J Biol Sci*, 24 (4):787-796.
- Labombarda F, Gonzalez SL, Deniselle MCG, Guennoun R, Schumacher M, de Nicola AF. 2002. Cellular basis for progesterone neuroprotection in the injured spinal cord. *Journal of Neurotrauma*, 19 (3):343-355.
- Ladewig J, Price EO, Hart BL. 1980. Flehmen in male goats: role in sexual behavior. *Behav Neural Biol*, 30 (3):312-322.
- Lam FC, Longnecker MT. 1983. A Modified Wilcoxon Rank Sum Test for Paired Data. *Biometrika*, 70 (2):510-513.
- Lansdowne AT, Provost SC. 1998. Vitamin D3 enhances mood in healthy subjects during winter. *Psychopharmacology*, 135 (4):319-323.
- Lee AC, He J, Ma M. 2011. Olfactory marker protein is critical for functional maturation of olfactory sensory neurons and development of mother preference. *J Neurosci*, 31 (8):2974-2982.
- Lehmann B, Meurer M. 2010. Vitamin D metabolism. *Dermatologic Therapy*, 23 (1):2-12.
- Li L, Haynes MP, Bender JR. 2003. Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor alpha variant (ER46) in human endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 (8):4807-4812.
- Liberles SD. 2014. Mammalian pheromones. *Annu Rev Physiol*, 76:151-175.
- Lomas DE, Keverne EB. 1982. Role of the vomeronasal organ and prolactin in the acceleration of puberty in female mice. *J Reprod Fertil*, 66 (1):101-107.
- Lutz LB, Jamnongjit M, Yang WH, Jahani D, Gill A, Hammes SR. 2003. Selective modulation of genomic and nongenomic androgen responses by androgen receptor ligands. *Molecular Endocrinology*, 17 (6):1106-1116.
- Ma M, Grosmaître X, Iwema CL, Baker H, Greer CA, Shepherd GM. 2003. Olfactory signal transduction in the mouse septal organ. *J Neurosci*, 23 (1):317-324.
- Majewska MD. 1992. Neurosteroids - Endogenous Bimodal Modulators of the Gaba-a Receptor - Mechanism of Action and Physiological Significance. *Progress in Neurobiology*, 38 (4):379-395.
- Margolis FL. 1982. Olfactory marker protein (OMP). *Scand J Immunol Suppl*, 9:181-199.
- Martin J, Lopez P. 2006. Vitamin D supplementation increases the attractiveness of males' scent for female Iberian rock lizards. *Proc Biol Sci*, 273 (1601):2619-2624.
- Mendoza AS. 1986. The Mouse Vomeronasal Glands - a Light and Electron-Microscopic Study. *Chemical Senses*, 11 (4):541-555.
- Meredith M, O'Connell RJ. 1979. Efferent control of stimulus access to the hamster vomeronasal organ. *J Physiol*, 286:301-316.
- Mithal A, Wahl DA, Bonjour JP, Burckhardt P, Dawson-Hughes B, Eisman JA, El-Hajj Fuleihan G, Josse RG, Lips P, Morales-Torres J, Advisors ICS. 2009. Global vitamin D status and determinants of hypovitaminosis D. *Osteoporosis International*, 20 (11):1807-1820.
- Mizwicki MT, Norman AW. 2009. The vitamin D sterol-vitamin D receptor ensemble model offers unique insights into both genomic and rapid-response signaling. *Sci Signal*, 2 (75):re4.
- Mujica-Parodi LR, Strey HH, Frederick B, Savoy R, Cox D, Botanov Y, Tolkunov D, Rubin D, Weber J. 2009. Chemosensory Cues to Conspecific Emotional Stress Activate Amygdala in Humans. *Plos One*, 4 (7).
- Norman A. 2012. Vitamin D. Elsevier.
- Norman A, Bouillon R, Farach-Carson M, Bishop J, Zhou L-X, Nemere I, Zhao J, Muralidharan K, Okamura W. 1993. Demonstration that 1 beta, 25-dihydroxyvitamin D3 is an antagonist of the nongenomic but not genomic

- biological responses and biological profile of the three A-ring diastereomers of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃. *Journal of Biological Chemistry*, 268 (27):20022-20030.
- Norman AW. 2006. Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. *Endocrinology*, 147 (12):5542-5548.
- Norman AW, Mizwicki MT, Norman DP. 2004. Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. *Nat Rev Drug Discov*, 3 (1):27-41.
- Norman AW, Nemere I, Zhou L-X, Bishop JE, Lowe KE, Maiyar AC, Collins ED, Taoka T, Sergeev I, Farach-Carson MC. 1992. 1, 25 (OH) 2-vitamin D₃, a steroid hormone that produces biologic effects via both genomic and nongenomic pathways. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 41 (3):231-240.
- Norman AW, Okamura WH, Hammond MW, Bishop JE, Dormanen MC, Bouillon R, Van Baelen H, Ridall AL, Daane E, Khoury R. 1997. Comparison of 6-s-cis-and 6-s-trans-locked analogs of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ indicates that the 6-s-cis conformation is preferred for rapid nongenomic biological responses and that neither 6-s-cis-nor 6-s-trans-locked analogs are preferred for genomic biological responses. *Molecular Endocrinology*, 11 (10):1518-1531.
- Nykjaer A, Dragun D, Walther D, Vorum H, Jacobsen C, Herz J, Melsen F, Christensen EI, Willnow TE. 1999. An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D₃. *Cell*, 96 (4):507-515.
- Ordenez-Moran P, Munoz A. 2009. Nuclear receptors: genomic and non-genomic effects converge. *Cell Cycle*, 8 (11):1675-1680.
- Pause BM. 2004. Are androgen steroids acting as pheromones in humans? *Physiol Behav*, 83 (1):21-29.
- Pet MA, Brouwer-Brolsma EM. 2016. The Impact of Maternal Vitamin D Status on Offspring Brain Development and Function: a Systematic Review. *Adv Nutr*, 7 (4):665-678.
- Plassart-Schiess E, Baulieu EE. 2001. Neurosteroids: recent findings. *Brain Res Brain Res Rev*, 37 (1-3):133-140.
- Ploss V, Gebhart VM, Dolz W, Jirikowski GF. 2014a. Sex hormone binding globulin in the rat olfactory system. *J Chem Neuroanat*, 57-58:10-14.
- Ploss VM, Gebhart VM, Gisder D, Dolz W, Jirikowski GF. 2014b. Localization of sex hormone binding globulin in the rat vomeronasal organ. *J Chem Neuroanat*, 61-62:120-123.
- Polgar Z, Kinnunen M, Ujvary D, Miklosi A, Gacsi M. 2016. A Test of Canine Olfactory Capacity: Comparing Various Dog Breeds and Wolves in a Natural Detection Task. *PLoS One*, 11 (5):e0154087.
- Prufer K, Jirikowski GF. 1997. 1,25-dihydroxyvitamin D-3 receptor is partly colocalized with oxytocin immunoreactivity in neurons of the male rat hypothalamus. *Cellular and Molecular Biology*, 43 (4):543-548.
- Prufer K, Veenstra TD, Jirikowski GF, Kumar R. 1999. Distribution of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor immunoreactivity in the rat brain and spinal cord. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 16 (2):135-145.
- Reddy DS. 2010. Neurosteroids: endogenous role in the human brain and therapeutic potentials. *Prog Brain Res*, 186:113-137.
- Riviere S, Challet L, Fluegge D, Spehr M, Rodriguez I. 2009. Formyl peptide receptor-like proteins are a novel family of vomeronasal chemosensors. *Nature*, 459 (7246):574-577.

- Robel P, Baulieu EE. 1995. Dehydroepiandrosterone (DHEA) is a neuroactive neurosteroid. *Ann N Y Acad Sci*, 774:82-110.
- Roberts EK, Lu A, Bergman TJ, Beehner JC. 2012. A Bruce effect in wild geladas. *Science*, 335 (6073):1222-1225.
- Rodewald A, Gebhart VM, Oehring H, Jirikowski GF. 2017a. The rat vomeronasal organ is a vitamin D target. *J Chem Neuroanat*, 81:42-47.
- Rodewald A, Mills D, Gebhart VM, Jirikowski GF. 2017b. Steroidal pheromones and their potential target sites in the vomeronasal organ. *Steroids*.
- Rodewald A, Gisder D, Gebhart VM, Oehring H, Jirikowski GF. 2016. Distribution of olfactory marker protein in the rat vomeronasal organ. *J Chem Neuroanat*, 77:19-23.
- Roslinski DL, Bhatnagar KP, Burrows AM, Smith TD. 2000. Comparative morphology and histochemistry of glands associated with the vomeronasal organ in humans, mouse lemurs, and voles. *Anat Rec*, 260 (1):92-101.
- Rupprecht R, Berning B, Hauser CA, Holsboer F, Reul JM. 1996. Steroid receptor-mediated effects of neuroactive steroids: characterization of structure-activity relationship. *Eur J Pharmacol*, 303 (3):227-234.
- Sankar R, Archunan G. 2004. Flehmen response in bull: role of vaginal mucus and other body fluids of bovine with special reference to estrus. *Behav Processes*, 67 (1):81-86.
- Sasuga S, Hidaka S, Ohkura S, Okamura H, Osada T. 2013. Gene expression of bovine vomeronasal receptors. *J Biol Sci*, 7:27-42.
- Savic I, Berglund H, Lindstrom P. 2005. Brain response to putative pheromones in homosexual men. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (20):7356-7361.
- Schumacher M. 1990. Rapid membrane effects of steroid hormones: an emerging concept in neuroendocrinology. *Trends Neurosci*, 13 (9):359-362.
- Simoncini T, Genazzani AR. 2003. Non-genomic actions of sex steroid hormones. *European Journal of Endocrinology*, 148 (3):281-292.
- Singer AG, Macrides F, Clancy AN, Agosta WC. 1986. Purification and analysis of a proteinaceous aphrodisiac pheromone from hamster vaginal discharge. *J Biol Chem*, 261 (28):13323-13326.
- Smith TD, Dennis JC, Bhatnagar KP, Garrett EC, Bonar CJ, Morrison EE. 2011. Olfactory marker protein expression in the vomeronasal neuroepithelium of tamarins (*Saguinus* spp). *Brain Res*, 1375:7-18.
- Soni M, Kos K, Lang IA, Jones K, Melzer D, Llewellyn DJ. 2012. Vitamin D and cognitive function. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, 243:79-82.
- Speeckaert M, Huang GM, Delanghe JR, Taes YEC. 2006. Biological and clinical aspects of the vitamin D binding protein (Gc-globulin) and its polymorphism. *Clinica Chimica Acta*, 372 (1-2):33-42.
- Stumpf WE, Sar M, Clark SA, DeLuca HF. 1982. Brain target sites for 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Science*, 215 (4538):1403-1405.
- Swaney WT, Keverne EB. 2009. The evolution of pheromonal communication. *Behav Brain Res*, 200 (2):239-247.
- Tarozzo G, Cappello P, De Andrea M, Walters E, Margolis FL, Oestreicher B, Fasolo A. 1998. Prenatal differentiation of mouse vomeronasal neurones. *Eur J Neurosci*, 10 (1):392-396.
- Thomas P. 2012. Rapid steroid hormone actions initiated at the cell surface and the receptors that mediate them with an emphasis on recent progress in fish models. *Gen Comp Endocrinol*, 175 (3):367-383.
- Tirindelli R, Dibattista M, Pifferi S, Menini A. 2009. From pheromones to behavior. *Physiol Rev*, 89 (3):921-956.

- Vaccarezza OL, Sepich LN, Tramezzani JH. 1981. The vomeronasal organ of the rat. *J Anat*, 132 (Pt 2):167-185.
- Van der Lee S, Boot L. 1955. Spontaneous pseudopregnancy in mice. *Acta physiologica et pharmacologica Neerlandica*, 4 (3):442.
- Vandenbergh JG. 1967. Effect of the presence of a male on the sexual maturation of female mice. *Endocrinology*, 81 (2):345-349.
- Vilensky JA. 2014. The neglected cranial nerve: nervus terminalis (cranial nerve N). *Clin Anat*, 27 (1):46-53.
- Wang YJ, Zhu JG, DeLuca HF. 2012. Where is the vitamin D receptor? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 523 (1):123-133.
- Weiler E, Benali A. 2005. Olfactory epithelia differentially express neuronal markers. *J Neurocytol*, 34 (3-5):217-240.
- Weiler E, McCulloch MA, Farbman AI. 1999. Proliferation in the vomeronasal organ of the rat during postnatal development. *European Journal of Neuroscience*, 11 (2):700-711.
- Wensley CH, Stone DM, Baker H, Kauer JS, Margolis FL, Chikaraishi DM. 1995. Olfactory marker protein mRNA is found in axons of olfactory receptor neurons. *J Neurosci*, 15 (7 Pt 1):4827-4837.
- White P, Cooke N. 2000. The multifunctional properties and characteristics of vitamin D-binding protein. *Trends Endocrinol Metab*, 11 (8):320-327.
- Wirsig CR, Leonard CM. 1987. Terminal nerve damage impairs the mating behavior of the male hamster. *Brain Res*, 417 (2):293-303.
- Wohrmann-Repenning A. 1984. [Comparative anatomical studies of the vomeronasal complex and the rostral palate of various mammals. I]. *Gegenbaurs Morphol Jahrb*, 130 (4):501-530.
- Wojtal K, Trojnar MK, Czuczwar SJ. 2006. Endogenous neuroprotective factors: neurosteroids. *Pharmacological Reports*, 58 (3):335-340.
- Yamada S, Shimizu M, Yamamoto K. 2003a. Structure-function relationships of vitamin D including ligand recognition by the vitamin D receptor. *Medicinal Research Reviews*, 23 (1):89-115.
- Yamada S, Shimizu M, Yamamoto K. 2003b. Vitamin D receptor. *Endocr Dev*, 6:50-68.
- Yang L, Ma JF, Zhang XL, Fan Y, Wang LN. 2012. Protective role of the vitamin D receptor. *Cellular Immunology*, 279 (2):160-166.
- Youngentob SL, Margolis FL. 1999. OMP gene deletion causes an elevation in behavioral threshold sensitivity. *Neuroreport*, 10 (1):15-19.
- Zanello LP, Norman AW. 2004. Rapid modulation of osteoblast ion channel responses by 1 α ,25(OH) $_2$ -vitamin D $_3$ requires the presence of a functional vitamin D nuclear receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (6):1589-1594.
- Zhang R, Naughton DP. 2010. Vitamin D in health and disease: Current perspectives. *Nutrition Journal*, 9.

9 Anhang

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Frontalschnitt durch das Vomeronasalorgan der Maus	3
Abb. 2 Sensorisches Epithel der Ratte	4
Abb. 3 Semidünnschnitt des nicht-sensorischen Epithels und der vomeronasalen Drüsen ...	5
Abb. 4 Umwandlung des Cholecalciferols in das biologisch aktive Calcitriol	13
Abb. 5 Calcitriol(1,25D)-Aufnahme in Caveolen über den membranassoziierten VDR	15
Abb. 6 Versuchsaufbau für die olfaktorischen Tests mit Wölfen und Hunden	40
Abb. 7 Erstkontakte in Abhängigkeit der Spezies und des Geschlechts	44
Abb. 8 Riechzeiten der Hunde an den Provitamin D-Konzentrationen	46
Abb. 9 Riechzeiten der Wölfe an den Provitamin D-Konzentrationen	47
Abb. 10 Vergleich der Riechdauern zwischen den Geschlechtern	48
Abb. 11 Varianten der molekularen Antwortmechanismen auf Vitamin D-Derivate	55

9.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Versuchstiere, die an den olfaktorischen Tests mit Provitamin D teilnahmen	41
Tab. 2 Reihenfolge und Anordnung der präparierten Versuchsblöcke.	42
Tab. 3 Wilcoxon-Signifikanztests	48
Tab. 4 Versuchstiere, die an den olfaktorischen Tests mit Cholecalciferol teilnahmen	57

9.4 Publikationsliste

Originalpublikationen und Fachbücher

- Rodewald A, Gebhart VM, Oehring H, Jirikowski GF. 2017. The rat vomeronasal organ is a vitamin D target. J Chem Neuroanat, 81:42-47.
- Rodewald A, Gisder D, Gebhart VM, Oehring H, Jirikowski GF. 2016. Distribution of olfactory marker protein in the rat vomeronasal organ. J Chem Neuroanat, 77:19-23.
- Gansloßer U, Rodewald A. 2017. Verhaltensbiologie der Hauskatze. Fürth, Germany: Filander Verlag.
- Rodewald A, Gansloßer U, Kölpin T. 2014. Influence of Fireworks on Zoo Animals: Studying different species at the Zoopark Erfurt during the Classic Nights. International Zoo News, 61 (4):264-271.

Reviews

- Rodewald A, Mills D, Gebhart V, Jirikowski GF. 2017. Steroidal pheromones and their potential target sites in the vomeronasal organ. Steroids (in Druck)
- Jirikowski GF, Rodewald A, Caldwell JD. 2016. Corticosteroid binding globulin (CBG) in central, systemic and cellular response. Current Trends in Endocrinology, 96(8):91-98.
- Jirikowski GF, Rodewald A, Sivikhina EV, Caldwell JD. Corticosteroid Binding Globulin. Reference Module on Neuroscience and Biobehavioral Psychology (in Druck)
- Caldwell JD, Londe K, Ochs SD, Hajdu Z, Rodewald A, Gebhart VM, Jirikowski GF. Three Steroid-binding Globulins, Their localization in the Brain and Nose, and What They Might be Doing There. Steroids (in Druck)
- Gebhart VM, Wong E, Caldwell JD, Kampa M, Rodewald A, Jirikowski GF. Estrogen Receptors and Sex Hormone Binding Globulin in neuronal cells and tissue. Steroids (akzeptiert)

Abstracts

- Rodewald A, Gebhart VM, Oehring H, Jirikowski GF. 2017. The vomeronasal organ is a vitamin D target. Poster. 12th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society, 22.-25.03.2017, Göttingen, Germany.

Rodewald A, Gebhart VM, Jirikowski GF. 2016. Vitamin D as an olfactory ligand. Poster. 111. Versammlung der Anatomischen Gesellschaft, 21.-24.09.2016, Göttingen, Germany.

Rodewald A, Gebhart VM, Jirikowski GF. 2016. Vitamin D binding in the vomeronasal organ. Poster. 10th RRSB Meeting, 02.-05.11.2016, Richmond Virginia, USA.

Jena, den

Andrea Rodewald

9.5 Danksagung

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Gustav Jirikowski für die Bereitstellung des spannenden Themas und die Möglichkeit, mich diesem Thema auf vielseitigem Weg nähern zu können. Er unterstützte mich in jeglicher Weise bei der Erstellung der Arbeit, jederzeit konnte ich mich mit Fragen oder Problemen an ihn wenden. Er schaffte insgesamt eine konstruktive, aber auch warmherzige Arbeitsatmosphäre.

Außerdem möchte ich Prof. Dr. Andreas Gebert für sein Vertrauen in meine Lehrtätigkeit und die konstruktiven und sehr hilfreichen Gespräche während meiner Promotion danken. Sie leisteten zum Gelingen der Arbeit einen großen Beitrag.

Ein großer Dank gilt auch Dr. Veronika Gebhart, die mir durch zahlreiche konstruktive und inspirierende Fachgespräche neue Aspekte des Themas aufwies. Sie unterstützte mich mit ihren methodischen Kenntnissen maßgeblich beim Erlernen wichtiger Arbeitstechniken.

OA Dr. Hartmut Oehring danke ich herzlichst für seine Unterstützung und seinen Beitrag durch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Ein großer Dank gilt auch Dr. Verena Ploss, Dr. Nicole Schmidt-Hertel, Falk Nitzsche und PD Dr. Elena Sivukhina für die mentale Unterstützung während der Endphase meiner Arbeit und die Zusammenarbeit im Rahmen der Lehrtätigkeit. Sabine Hitschke möchte ich für die Hilfe im Labor danken.

Weiterhin gilt auch meiner Familie, besonders meiner Mutter, die mich immer bei allen Ideen und Plänen unterstützte, ein großer Dank. Bei Christian Gaida möchte ich mich für seine Geduld und sein Verständnis, besonders während der Endphase meiner Arbeit, bedanken.

Jena, den

Andrea Rodewald

9.6 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,
ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. G. F. Jirikowski, Dr. U. Gansloßer, Dr. V. Gebhart und OA Dr. H. Oehring,
die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder
unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die
im
Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und
dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht
bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den

Andrea Rodewald